

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss des Pneumoperitoneums auf
die Ultrastruktur des Peritoneums:
Eine rasterelektronenmikroskopische
Studie.**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Jens Jakob
aus Lingen an der Ems

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C.A. Jacobi
 2. Prof. Dr. med. L. Krähenbühl
 3. PD. Dr. med. M. Pross

Datum der Promotion: 11.06.2004

Inhaltsangabe

Hintergrund: Der Einsatz minimal invasiver Techniken in der onkologischen Chirurgie wird wegen der Berichte über Trokarmetastasen kontrovers diskutiert. Die Pathogenese von Inzisionsmetastasen und intraperitonealem Tumorwachstum ist bisher nicht bekannt. Als mögliche Ursachen kommen bei Einsatz der laparoskopischen Chirurgie auch Einflüsse von Gas und Druck auf das Peritoneum in Betracht. Dabei könnte eine peritoneale Inflammation die Adhäsion und das Wachstum von Tumorzellen begünstigen. Wir untersuchten den Einfluss eines CO₂- und Helium- Pneumoperitoneums auf die Morphologie des Rattenperitoneums. **Methoden:** Bei insgesamt 50 Ratten (BD IX) erfolgte die intraabdominelle Injektion von Tumorzellen (DHB/TRb) und im Anschluß für 30 min der Aufbau eines CO₂-oder Helium-Pneumoperitoneums mit einem Druck von 15 mm Hg. Nach definierten Zeitpunkten (2, 12, 24, 48 und 96h) wurden die Tiere geopfert und Proben des Peritoneums rasterelektronenmikroskopisch auf inflammatorische Veränderungen untersucht. Bei den Kontrolltieren wurde keine Pneumoperitoneum aufgebaut. **Ergebnisse:** Bei allen Kontrolltieren war das Peritoneum frei von entzündlichen Veränderungen. Sowohl in der CO₂ als auch in der Helium-Gruppe lagen bei 21 von 25 Tieren ebenfalls keine entzündlichen Veränderungen vor. Lediglich bei vier Tieren jeder Gruppe fanden sich Alterationen des Mesothel, die auf eine Inflammation hindeuteten. Tumorzellen wurden in insgesamt sechs Tieren nachgewiesen. In keinem Fall kam es zu einem nodulären oder diffusen intraperitonealen Tumorwachstum. **Schlussfolgerung:** Morphologisch zeigt das Rattenperitoneum nach Tumorzellinjektion und CO₂- bzw. Helium- Pneumoperitoneum keine Veränderungen, die ein intraperitoneales Tumorwachstum begünstigen könnten. Alterationen des Peritoneums infolge eines Pneumoperitoneums scheinen daher nicht die Ursache für das Auftreten von Metastasen nach minimal-invasiven Operationen zu sein.

Schlüsselwörter: CO₂ – Helium – Pneumoperitoneum –
Rasterelektronenmikroskopie – Peritoneum – Minimal invasive Chirurgie

Abstract

Objective: Laparoscopic surgery in patients with cancer has been discussed controversially because of the susceptibility of laparoscopic incisions for metastatic tumour growth. The mechanisms of port-site metastases and intraperitoneal tumour growth are still unknown. One reason might be the influence of insufflation gas and pressure on the peritoneum. A structural damage of the mesothelial layer due to the pneumoperitoneum might facilitate tumour cell adhesion and growth. We have examined the influence of CO₂- and helium- pneumoperitoneum on the morphology of the peritoneum. **Methods:** A total of 50 rats (BD IX) received colon carcinoma (DHB/TRb) cells intraperitoneally and CO₂ or Helium were used for insufflation at a pressure of 15 mm Hg for 30 minutes. After different time periods (2, 12, 24, 48 and 96h) rats were killed and the peritoneum was examined by scanning electron microscopy. Controls were without pneumoperitoneum. The peritoneum was examined by scanning electron microscopy. **Results:** Controls and most of the rats with pneumoperitoneum showed no peritoneal alterations. In 4 animals of each group inflammatory alterations of the peritoneum such as bulging and retraction of mesothelial cells were observed at different time points. Tumour cells adherent to the peritoneum were found in a total of 6 animals. Peritoneal carcinomatosis, tumour nodules or infiltration of the peritoneum by tumour cells were not observed. **Conclusions:** Our study demonstrates that the morphologic integrity of the rat peritoneum is not disturbed when CO₂ or helium are used for insufflation combined with the intraperitoneal injection of carcinoma cells. Pneumoperitoneum therefore is probably not the condition causing peritoneal changes that favour intraperitoneal tumour growth.

Key words: CO₂ – helium – pneumoperitoneum – scanning electron microscopy – peritoneum

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	13
1.1	Laparoskopie	13
1.1.1	Historische Aspekte	13
1.1.2	Technische Aspekte	14
1.1.3	Auswirkungen der Laparoskopie auf verschiedene Organsysteme und Vergleich zum konventionellen Operationsverfahren	15
1.1.4	Einsatz von Helium und gasloser Laparoskopie	19
1.2	Laparoskopie und Tumorchirurgie.....	21
1.2.1	Einsatz der Laparoskopie in der Tumorchirurgie.....	21
1.2.2	Pathophysiologie von Trokarmetastasen und intraperitonealem Tumorstadium.....	23
1.3	Morphologische Studien des Peritoneums	28
1.3.1	Morphologie des Peritoneums bei Ratte und Mensch.....	28
1.3.2	Veränderungen der Morphologie des Peritoneums nach Einwirkung unterschiedlicher Noxen.....	30
1.3.3	Studien zur Morphologie des Peritoneum nach Pneumoperitoneum.....	33
2	Herleitung der Fragestellung und Planung des Experiments.....	37
3	Material und Methodik	41
3.1	Tierexperiment	41
3.1.1	Tierart und Tumorzelllinie	41
3.1.2	Einteilung der Gruppen	42
3.1.3	Pneumoperitoneum	43
3.1.4	Biopsieentnahme	44
3.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	45
3.2.1	Technische Aspekte	45

3.2.2	Präparation von Proben und Tumorzellen	46
3.2.3	Befundung und Diagnosestellung	48
3.3	Statistik	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Mikroskopie des intakten Mesothels	51
4.2	Aufnahmen von Tumorzellen	52
4.3	Dokumentation der Einzelbefunde	53
4.3.1	Separation der Mesothelzellen.....	53
4.3.2	Retraktion der Mesothelzellen.....	54
4.3.3	Lokal begrenzte Entzündung	55
4.3.4	Mechanisch verursachte Läsion des Peritoneums	56
4.3.5	Risse in der Oberfläche.....	57
4.3.6	Erythrozyten	57
4.3.7	Feinkörnige Beläge.....	58
4.3.8	Rundzellen	59
4.4	Häufigkeit der Einzelbefunde	60
4.5	Ergebnisse der Kontrollgruppe	61
4.6	Ergebnisse der Kohlendioxidgruppe.....	62
4.7	Ergebnisse der Heliumgruppe.....	64
4.8	Statistische Auswertung.....	67
5	Diskussion	69
5.1	Interpretation der Einzelbefunde	69
5.1.1	Artefakte	69
5.1.2	Entzündliche Veränderungen des Mesothels.....	70
5.1.3	Rund – und Tumorzellen	71

5.2	Interpretation der Ergebnisse	73
5.2.1	Intakte Morphologie des Rattenperitoneums nach Pneumoperitoneum?	73
5.2.2	Inzisionsmetastasen und intraperitoneales Tumorwachstum	78
6	Zusammenfassung	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Eidesstattliche Erklärung.....	93
9	Lebenslauf.....	95
10	Danksagung	97

1 Einleitung

1.1 Laparoskopie

1.1.1 Historische Aspekte

1901 inspizierte Kelling aus Dresden laparoskopisch die Bauchhöhle eines Hundes. Er verwendete ein Pneumoperitoneum, welches mit gefilterter Luft aufgebaut wurde. Am Menschen führte 1910 der Schwede Jacobaeus die erste Laparoskopie mit einem Luft-Pneumoperitoneum durch. Lange Zeit blieb die Laparoskopie ein unzulängliches Verfahren in Diagnostik und Therapie und einer kleinen Gruppe von Chirurgen vorbehalten. Weiterentwicklungen von Optik und Operationsinstrumenten wie z. B. Schräg- oder Kaltlichtoptik haben daran bis zum Beginn der achtziger Jahre nichts geändert.

Der Kieler Gynäkologe Semm hat die Entwicklung entscheidend vorangetrieben. Er entwickelte die kontrollierte und automatische Gasinsufflation, die für einen konstanten Druck sorgte, sowie geeignete Operationsinstrumente wie Nadelhalter und atraumatische Klemmen. 1982 führte er die erste laparoskopische Appendektomie durch. 1985 absolvierte Mühe aus Böblingen die erste laparoskopische Cholezystektomie. Rasch folgten andere Operationen wie Hernioplastik, Hysterektomie und Vagotomie. Je mehr sich Vorteile und Durchführbarkeit zeigten, desto mehr fand die Laparoskopie weite Verbreitung und Akzeptanz. (Nezhat 1998).

Heute gehören laparoskopische Appendektomie, Hernioplastik, Splenektomie, Adrenalektomie u.a. zu den Standardoperationen, ebenso Eingriffe an Kolon und Rektum bei gutartigen Erkrankungen. Die laparoskopische Cholezystektomie hat sich bei symptomatischer Gallensteinerkrankung zum Verfahren der Wahl entwickelt. Umstritten ist der Einsatz minimal invasiver Techniken noch immer in der Tumorchirurgie (Whelan 2001).

Weiterentwicklungen der minimal invasiven Chirurgie fanden u.a. im Bereich der Roboter- und Telechirurgie statt. So können Operationsroboter wie z.B. Da Vinci oder Zeus nicht nur die Kameraführung übernehmen, sondern – gesteuert durch einen

Chirurgen – auch die Führung der Instrumente (Ballantyne 2002). Für das manuelle Training in dieser anspruchsvollen chirurgischen Disziplin wurden außerdem Operationssimulatoren entwickelt, so dass die Ausbildung neben der Weitergabe von Wissen und Erfahrung durch erfahrenere Chirurgen durch virtuelle Realität und interaktive Simulation unterstützt werden kann (Hyltander 2002).

1.1.2 Technische Aspekte

Die apparative Grundausstattung zur operativen Laparoskopie besteht aus einem CO₂ - Insufflator, einer Kamera mit Videogerät und Monitor, einer Thermo- und Elektrokoagulationseinheit, einer Lichtquelle für die Optik und einer Saugspüleinrichtung. Die Funktionen der Instrumente entsprechen weitgehend denen der konventionellen offenen Chirurgie, Aufbau und Handhabung unterscheiden sich jedoch aufgrund des veränderten Zugangs zum Operationsfelds zum Teil erheblich. Generell weisen sie einen geringeren Durchmesser auf und sind wesentlich länger. Neben derart modifizierten Nadelhaltern, Klemmen und Faszangen etc. stehen auch Kombinationsinstrumente wie z. B. Koagulationshaken mit Sauger zur Verfügung (Kremer, Platzer, Schreiber, Steichen 2001).

Die Anlage des Pneumoperitoneums erfolgt unter Verwendung einer Veress-Nadel oder in offener Technik. Nach einer Hautinzision meist unterhalb des Nabels wird entweder die Bauchhöhle durch eine Veress-Nadel punktiert, deren sichere intraabdominale Lage geprüft, Gas insuffliert und die Nadel durch einen Trokar ausgetauscht; alternativ wird die Faszie freipräpariert, angeklemmt und inzidiert, um stumpf einen Trokar in die Bauchhöhle einzubringen, durch den die Insufflation von ca. 3-5 l CO₂ bis ein intraabdomineller Druck von 12-15 mm Hg erreicht ist. Nach Aufbau des Pneumoperitoneums wird eine Optik eingebracht und unter Sicht folgt das Einbringen weiterer Trokare und Instrumente, deren Lokalisation und Anzahl von der entsprechenden Operation abhängen. (Berci 1995, Kirk 1997).

Bei einer Vielzahl von Operationen gleichen sich die weiteren Operationsschritte laparoskopischer und konventioneller Technik, wie z.B. die Darstellung des Calot'schen Dreiecks zur Durchführung einer Cholezystektomie. Dagegen werden z.B. bei der Hernienreparatur unterschiedliche Prinzipien verfolgt: laparoskopisch erfolgt der Bruchpfortenverschluss hier nicht durch Fasziennaht wie beim klassischen

konventionellen Vorgehen nach Shouldice oder Bassini, sondern durch Vorlegen eines Kunststoffnetzes, wobei im Gegensatz zum offenen Verfahren in Abhängigkeit von der Lokalisation des Netzes eventuell die Peritonealhöhle eröffnet wird. Einige Eingriffe lassen sich nicht ausschließlich minimal invasiv durchführen. So kann für die Entfernung größerer Resektate oder das Anlegen einer Darmanastomose bei Koloneingriffen eine Minilaparotomie notwendig werden (Rittmann/Koller 1994).

Für den Operateur bedeutet minimal invasives Operieren zunächst, ein unterschiedliches Instrumentarium zu verwenden und den Umgang damit zu erlernen. Weiterhin verliert der Chirurg die Möglichkeit, seinen Tastsinn als diagnostisches Instrument einzusetzen, das Erkennen bzw. Beurteilen einzelner Strukturen ist somit erschwert. Der Blick des Operateurs ist während laparoskopischen Operierens nicht direkt auf den Operationssitus und seine Hände, sondern auf einen Bildschirm gerichtet, dieser gewährt außerdem nur ein zweidimensionales Bild der Anatomie. Ein Vorteil der minimal invasiven Chirurgie ist die Möglichkeit, das gesamte Abdomen zu überblicken. So bietet z.B. ein Wechselschnitt zur konventionell durchgeführten Appendektomie im Gegensatz zum laparoskopischen Vorgehen weniger Möglichkeiten, weitere Differentialdiagnosen durch Exploration der Bauchhöhle auszuschließen.

Spezifische Komplikationen der Laparoskopie sind Organverletzung beim Einbringen der Trokare, Entstehung von Pneumothorax, Mediastinal- und Hautemphysemen sowie postoperativer Schulterschmerz. Die Morbidität dieser Komplikationen liegt bei ca. 2 % in Abhängigkeit von der Erfahrung des Operateurs, dem Alter der Patienten und der Indikation (Sarli 2000, Murdock 2000). In 2 % der Laparoskopien erzwingen starke Adhäsionen bzw. intraoperative Komplikationen wie z.B. starke Blutungen ein Umsteigen auf das konventionelle Verfahren (Gebhard 2001).

1.1.3 Auswirkungen der Laparoskopie auf verschiedene Organsysteme und Vergleich zum konventionellen Operationsverfahren

Die Anlage eines Pneumoperitoneums mit Verwendung von Gasen und einem erhöhten intraabdominellen Druck hat einen direkten Einfluss auf verschiedene Organsysteme sowie auf bereits bestehende Erkrankungen. Viele Arbeiten unterstreichen den minimal invasiven Charakter der Laparoskopie und belegen in experimentellen und klinischen Studien die Vorteile dieser Operationstechnik hinsichtlich klinischer und

immunologischer Parameter im postoperativen Verlauf. Trotzdem gibt es Publikationen, in denen negative Aspekte des Pneumoperitoneums mit Insufflation von Kohlendioxid gefunden wurden.

In klinischen Studien zu den Auswirkungen des Pneumoperitoneums auf das hämodynamische System konnte im Vergleich zur konventionellen Technik eine Verminderung der kardialen Aufwurfleistung, eine Erhöhung des arteriellen Mitteldrucks sowie eine Erhöhung der Herzfrequenz gezeigt werden (Galizia 2001, Dexter 1999, Cunningham 1994). Die Veränderungen werden auf den erhöhten intraabdominellen Druck und eine dadurch verminderte Vorlast sowie eine Aktivierung des neurohumeralen vasoaktiven Systems zurückgeführt. In Übereinstimmung damit wurde ein deutlich geringeres Ausmaß dieser Effekte bei einem niedrigeren Insufflationsdruck festgestellt (Dexter 1999). Bei jüngeren, gesunden Patienten mit den ASA-Klassen 1 oder 2 erwiesen sich kardiozirkulatorische Veränderungen nach Desufflation als schnell und komplett reversibel und führten im Allgemeinen nicht zu einer Erhöhung der Morbidität oder Mortalität (Galizia 2001, Johannsen 1989, Volpino 1998). Patienten der ASA Klassen 3 oder 4 könnten jedoch einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Komplikationen ausgesetzt sein, insbesondere dann, wenn ein hoher Insufflationsdruck verwendet wird und präoperativ keine gesteigerte Volumenzufuhr erfolgt (Schulte-Steinberg 1996, Stuttmann 1995).

Die Anlage eines Pneumoperitoneum führt zu signifikanten respiratorischen Veränderungen. So zeigten prospektive randomisierte Studien, dass während laparoskopischer Cholezystektomien eine Hyperkapnie besteht und der arterielle pH-Wert sinkt, der Lungenbeatmungsdruck ansteigt und die Compliance der Lunge abnimmt (Volpino 1998, Chmielnicki 1994). Die Veränderungen der Compliance und des Beatmungsdruckes sind insufflationsdruckabhängig (Wallace 1997). Zur Vermeidung minderbelüfteter Areale und Bildung von Atelektasen ist der Einsatz einer Beatmung mit positivem endexpiratorischen Druck erforderlich, der jedoch bei COPD – Patienten zur Überblähung der Lunge führen kann. Einer Hyperkapnie durch resorbiertes CO₂ mit arterieller Azidose sollte bei beatmeten Patienten durch eine situationsadaptierte Hyperventilation begegnet werden (Wurst 1996). Insgesamt scheinen die Veränderungen bei lungengesunden Patienten von geringer klinischer Relevanz zu sein. Hinsichtlich der postoperativen Lungenfunktion konnte in einer

Studie von Schwenk et al. sogar ein Vorteil der laparoskopischen gegenüber der konventionellen Technik gezeigt werden (Schwenk 1999).

Tierexperimentelle Studien belegen, dass die Erhöhung des intraabdominellen Drucks auch zu Veränderungen der kardiovaskulären Parameter und der Durchblutung intraabdomineller Organe führt. Unklar ist jedoch, inwieweit diese klinisch relevant sind. So zeigte Eleftheriadis in einer klinischen, prospektiv vergleichenden Studie zwischen laparoskopischer und konventioneller Cholezystektomie, dass bei laparoskopisch operierten Patienten die hepatische Mikrozirkulation und der pH der Magenschleimhaut signifikant vermindert sind (Eleftheriads 1996). Iwase et al. verglichen in einer ähnlichen Studie den effektiven renalen Plasmafluss und die glomeruläre Filtrationsrate (Iwase 1993). Auch hierbei konnte jeweils eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate in der minimal invasiv behandelten Gruppe festgestellt werden. In beiden Studien zeigte sich allerdings direkt nach Desufflation eine vollständige Kompensation auf die Ausgangswerte. In keiner Studie wurden bisher ein Einfluss dieser Veränderungen auf den weiteren klinischen Verlauf geschildert. In einer prospektiven randomisierten Studie von Böhm et al. konnte kein Unterschied postoperativer Leber- und Nierenfunktion nach laparoskopischen und konventionellen kolorektalen Resektionen festgestellt werden (Böhm 1999a).

Ein steigender intraabdomineller Druck während laparoskopischer Operationen führt zu einem verminderten venösen Rückfluss von der Peripherie zum Herzen. Theoretischerweise könnte es durch die dadurch verursachte Blutstase zu einem Anstieg thrombembolischer Komplikationen kommen. In einem Review mit Ergebnissen von 50427 Laparoskopien traten tiefe Beinvenenthrombosen und Lungenembolien mit einer Inzidenz von 0,2 % auf. Im Vergleich dazu wurde die Inzidenz fataler Lungenembolien in einer Übersichtsarbeit zur Häufigkeit von thrombembolischen Komplikationen nach konventionellen Operationen mit 0,8 % angegeben (Collins 1988). In einer nicht – randomisierten Studie fanden Lord et al. keinen Unterschied bei der Häufigkeit der Beinvenenthrombose zwischen konventionellem und laparoskopischem Verfahren (Lord 1998). Bei Durchführung einer standardisierten Thromboseprophylaxe erscheint die Inzidenz der thrombembolischen Komplikationen unabhängig vom Operationsverfahren zu sein. Abgesehen davon bietet sich zur Verminderung der

Blutstase in den unteren Extremitäten der Einsatz der intermittierenden pneumatischen Kompression an.

Der Organismus reagiert auf Verletzung oder Operation systemisch mit einer neuroendokrinen Stressreaktion, die zu einer katabolen Stoffwechsellage und Immunsuppression führt, über deren Ausmaß u.a. Veränderungen von Immunparametern wie IL-6, CRP, Leukozyten oder Makrophagenaktivität Rückschlüsse erlauben. Die Ergebnisse tierexperimenteller Studien weisen auf eine verminderte systemische Inflammation und geringere Suppression der Immunantwort nach einer Laparoskopie im Vergleich zur Laparotomie hin (Allendorf 1996, Jacobi 1998a). Eine Vielzahl von klinischen Studien u. a. bezüglich der Cholezystektomie, der Fundoplikatio und kolorektaler Resektionen bestätigen diese Ergebnisse (Karaviannakis 1997, Ordemann 2001, Perttila 1999). Allerdings liegen auch Ergebnisse vor, die im randomisierten Vergleich keinen Unterschied zwischen beiden Operationstechniken nachweisen konnten (McMahon 1993, Ortega 1996) oder sogar eine stärkere Immunsuppression durch die Laparoskopie implizierten (Stage 1997). Keine der genannten Studien konnte eine Korrelation zwischen immunologischen Veränderungen und postoperativem Verlauf nachweisen, womit die Frage nach der klinischen Relevanz der Ergebnisse weiterhin unbeantwortet bleibt.

Im postoperativen Verlauf laparoskopischer Operationen konnten in verschiedenen Publikationen im Vergleich zu konventionellen offenen Verfahren eine geringerer Analgetikaverbrauch, eine verkürzte Rekonvaleszenzzeit, eine verminderte Rate an Wundkomplikationen und frühere Entlassung aus dem Krankenhaus nachgewiesen werden (Milsom 1998, Nilsson 2000, Squirrel 1998). Diese Vorteile werden auf die geringere Traumatisierung, bedingt durch die fehlende Laparotomienarbe und das gewebeschonende minimal invasive Operieren zurückgeführt. Es liegen jedoch auch prospektiv randomisierte Studien vor, in denen kein Unterschied im postoperativen Schmerzmittelverbrauch nachgewiesen wurde, und die Rekonvaleszenz unabhängig von der angewendeten Technik war (Tate 1993, Majeed 1996). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse von sehr verschiedenen Eingriffen wie Cholezystektomie, Appendektomie, Fundoplikatio und kolorektalen Eingriffen stammen und neben dem Bauchwandtrauma zumindest auch das intraabdominelle Trauma und die – bei laparoskopischen Operationen längere – Operationszeit zu beachten sind.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die laparoskopische Technik bessere kosmetische Ergebnisse erzielt, bislang jedoch mit höheren Kosten verbunden ist. Negative intraoperative pulmonale und hämodynamische Veränderungen sind reversibel und gehen – außer bei schweren Vorerkrankungen – nicht mit erhöhten Risiken für die Patienten einher. Im postoperativen Verlauf scheinen die Immunsuppression geringer, die Rekonvaleszenzzeit kürzer sowie der Analgetikaverbrauch vermindert zu sein.

1.1.4 Einsatz von Helium und gasloser Laparoskopie

Als Insufflationsgas wird fast ausschließlich CO₂ eingesetzt. Es ist farb- und geruchlos, nicht brennbar, preiswert und wird rasch über die Lunge ausgeschieden. Aufgrund hämodynamischer und pulmonaler Nebenwirkungen sowie im Rahmen der Kontroverse über der Einsatz der Laparoskopie in der Tumorchirurgie wurden Alternativen zum CO₂-Pneumoperitoneum entwickelt. Für die Etablierung eines Pneumoperitoneums kommen aber grundsätzlich auch Edelgase wie Helium oder Argon in Betracht, mit entsprechenden Hilfsmitteln kann eine Laparoskopie auch gaslos durchgeführt werden. (Neuhaus 2001)

Das Edelgas Helium ist chemisch inert und schlechter wasserlöslich als CO₂. Daher wurde angenommen, dass die Verwendung von Helium als Insufflationsgas geringere kardiorespiratorische Nebenwirkungen verursacht. Jacobi et al. zeigten anhand eines Tiermodells am Schwein, dass die Verwendung von Helium im Gegensatz zu CO₂ keine wesentlichen respiratorischen Veränderungen (z.B. Hyperkapnie und PH-Werterniedrigung) verursacht, und die kardialen Auswirkungen eines Helium-Pneumoperitoneums (z.B. Erhöhung des arteriellen Mitteldrucks)(1.1.3) denen des Kapnoperitoneums gleichen (Jacobi 2000a). Klinische Studien konnten die tierexperimentellen Daten bestätigen (Fernandez-Cruz 1998, McMahon 1994). Die geringere Löslichkeit von Helium könnte sich jedoch auch nachteilig auswirken. So besteht die Befürchtung, bei akzidenteller Insufflation in Gefäße, Haut oder Thorax könnten entstehende Helium-Gasembolien, Emphyseme bzw. Pneumothoraces schwerwiegendere Folgen haben als unter Verwendung von CO₂. Die direkte Injektion von Helium oder CO₂ in die Femoralvene bei Schweinen führte zu Todesfällen durch Helium, während die Kohlendioxidinjektion von allen Tieren überlebt wurde (Roberts 1997). Dieses Szenario wäre jedoch nur bei Punktion eines Gefäßes beim Einbringen

der Veress-Nadel denkbar. Der klinischen Situation eher entsprechend wurde in dem oben genannten Experiment von Jacobi et al. im Verlauf bei einem Druck von 15 mm Hg die Vena cava um ca. 1 cm eröffnet. Dabei kam es weder bei CO₂ noch bei Helium zu einer Gasembolie. Klinische Daten hierzu liegen nicht vor (Jacobi 2000a).

Um die kardiopulmonalen Nebenwirkungen der minimal invasiven Technik zu vermeiden und gleichzeitig die Vorteile des weniger invasiven Operationszugangs zu erhalten, wurden die Bauchdecke anhebende Instrumente entwickelt, um Laparoskopien gaslos zu ermöglichen. Außerdem kann diese Technik mit einem Niedrigdruckpneumoperitoneum kombiniert werden. Unter Verwendung verschiedener Systeme ist so die technische Durchführbarkeit von gaslos laparoskopischen Cholezystektomien bis hin zu kolorektalen Eingriffen gezeigt worden (Schulze 1999). Hinsichtlich der negativen kardiorespiratorischen Effekte des Kapnoperitoneums konnten randomisierte klinische Studien belegen, dass intraoperativ die negativen Auswirkungen auf kardiopulmonale Faktoren wie Erhöhung der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Drucks, Verringerung der Compliance sowie Erhöhung des Beatmungsdrucks bei gaslos durchgeführten Operationen in signifikant geringerem Maße bzw. nicht auftraten (Galizia 2001, Koivusalo 1998, Ogihara 1999). Untersuchungen von Kim et al. hinsichtlich immunologischer Parameter wie Leukozytenanzahl, IL 6 und TNF α bei konventionellen oder gaslosen laparoskopischen Cholezystektomien ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen; ebenso konnten Larsen et al. keine wesentlichen Differenzen bei postoperativen Schmerzen und postoperativer Rekonvaleszenz zeigen (Kim 2002, Larsen 2001). Mehrere Autoren berichteten jedoch, dass sich die Operationszeit bei gaslosen Eingriffen verlängerte (Larsen 2001, Johnson 1997, Galizia 2001). Dies wurde u.a. auf die aufwendigere Technik der Hebesysteme und die eingeschränkte Exposition des Operationsfeldes zurückgeführt. Besonders bei ausgedehnteren und technisch aufwendigeren Operationen könnte ein erhöhtes Gewebetrauma die Folge sein.

Die Verwendung von Helium und gasloser Laparoskopie stellen grundsätzlich Alternativen zum Kapnoperitoneum dar, insbesondere bei Vorliegen respiratorischer bzw. kardialer Vorerkrankungen. Beide Verfahren spielen jedoch wegen der geringen klinischen Erfahrung und mangelnder klinischer Studien eine untergeordnete Rolle. Bei Helium sind außerdem die höheren Kosten sowie die Gefahr einer Gasembolie zu

erwähnen, im Falle der gaslosen Laparoskopie der höhere technische Aufwand, die längere Operationszeit sowie die eingeschränkte Sicht in den Operationssitus.

Auf Überlegungen und experimentelle Daten hinsichtlich der Frage, inwieweit Helium-Pneumoperitoneum oder gaslose Laparoskopie in der Tumorchirurgie eine Alternative zum Kapnoperitoneum darstellen, wird im Kapitel 1.2.2 eingegangen.

1.2 Laparoskopie und Tumorchirurgie

1.2.1 Einsatz der Laparoskopie in der Tumorchirurgie

Mit der Einführung minimal invasiver Operationsverfahren in die Abdominalchirurgie wurden auch laparoskopische Techniken zur radikalen Resektion maligner Tumore, z.B. kolorektaler Karzinome entwickelt. In diesem Zusammenhang wäre es nicht akzeptabel, dass mit einer neuen Operationstechnik möglicherweise die etablierten Prinzipien der Tumorchirurgie preisgegeben werden. Weiterhin muss evaluiert werden, inwieweit das neue Verfahren für den Patienten Vorteile in der postoperativen Phase bietet oder ob es spezifische Gefahren bedeutet. Letztendlich sollten Langzeitergebnisse untersucht werden, um sicherzustellen, dass die Prognosen der laparoskopisch operierten Patienten besser oder gleichwertig gegenüber der Prognosen konventionell Operierten ist.

In verschiedenen Studien ist gezeigt worden, dass laparoskopisch radikale Resektionen von kolorektalen malignen Tumoren möglich sind. Die Untersuchung der Parameter R0-Resektion, Abstand der Resektionsränder vom Primärtumor und Anzahl der entnommenen Lymphknoten zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen konventionellen und laparoskopischen Resektionen (Franklin 1996, Milsom 1998, Fleshman 1999).

Zur Beurteilung der postoperativen Phase wurden eine Reihe vergleichender Studien durchgeführt (Lacy 1995, Milsom 1998, Schwenk 1998). Hierbei wurden postoperative Vorteile im kurzfristigen Verlauf belegt: bessere Lungenfunktion, weniger Schmerzen, kürzere Dauer der Darmatonie und schnellere Rekonvaleszenz. Von besonderem Interesse sind diese Daten, da eine schnellere Rekonvaleszenz und ein besser erhaltenes Immunsystem des Patienten die Absiedlung verbliebener Tumorzellen verhindern, bzw.

einen früheren Einsatz adjuvanter Chemo- oder Immuntherapien ermöglichen könnte (Whelan 2001).

Ergebnisse aus prospektiv randomisierten Studien zur Bewertung der Langzeitergebnisse (Rezidive und Überlebenszeit) liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor. Bisherige Daten aus prospektiven Kohortenstudien dokumentieren, dass die Prognose nach minimal-invasiven Eingriffen ungefähr denen nach konventionellen Resektionen entsprechen (Poulin 1999, Lechaux 2002, Fleshman 1999, Franklin 2000).

Bedenken gegenüber dem Einsatz minimal invasiver Verfahren in der onkologischen Chirurgie entstanden durch die zahlreichen Berichte über Trokarmetastasen nach laparoskopischen Eingriffen (Schaeff 1998b). Klinisch fallen diese Inzisionsmetastasen als schmerzhafte Vorwölbung im Bereich einer Narbe auf. Prinzipiell können sie nach Punktionen, Biopsieentnahmen oder Operationen vorkommen. Im Zusammenhang mit laparoskopischen Prozeduren wurden Fälle von Trokarmetastasen bei Kolon-, Ovarial-, Magen- und okkultem Gallenblasenkarzinomen beschrieben sowie nach diagnostischen Laparoskopien (Berends 1994, Schaeff 1998b). In den ersten Publikationen über laparoskopische Resektionen wurde die Rate von Implantationsmetastasen mit bis zu 20 % angegeben (Wexner 1995). Daten neuerer Studien zeigten jedoch durchschnittlich niedrigere Inzidenzen dieser Metastasen von ca. 0,7 – 1,5 % (Schiedeck 2000, Curet 2000, Hartley 2000), vergleichbar also mit der Rate bei konventionellen Eingriffen (ca. 0,6 – 1,6 %) (Reilly 1996). Die Ätiologie der Inzisionsmetastasen ist bisher ungeklärt. Ergebnisse experimenteller und klinischer Studien deuten daraufhin, dass die intraoperative Manipulation am tumortragenden Organ die Hauptursache dieses Phänomens ist. Es stellt sich jedoch die Frage, ob auch die spezifischen Bedingungen des Pneumoperitoneums einen Einfluss auf die Metastasierung haben. Hierauf wird näher im nächsten Kapitel (1.2.2) eingegangen.

Maligne Tumore können also unter Zuhilfenahme minimal invasiver Techniken radikal reseziert werden, dabei könnten sich immunologische postoperative Vorteile auch positiv auf die Prognose auswirken (Whelan 2001). Langzeitergebnisse hierzu liegen jedoch noch nicht vor. Weiterhin muss noch die Ursache der im Zusammenhang mit der laparoskopischen Technik aufgetretenen Trokarmetastasen erforscht werden.

1.2.2 Pathophysiologie von Trokarmetastasen und intraperitonealem Tumorwachstum

Für die Entstehung von Portmetastasen werden hauptsächlich instrumentelle Manipulation am tumortragenden Organ und intraoperative Kontamination der Bauchhöhle mit Tumorzellen verantwortlich gemacht. Prinzipiell müssen jedoch auch Faktoren des Pneumoperitoneums und dessen Auswirkung auf das intraperitoneale Milieu als Ursache in Betracht gezogen werden. Berichte über Inzisionsmetastasen nach Staginglaparoskopien oder Entfernung von UICC stage I Kolontumoren, bei denen der Tumor keinen Kontakt mit Instrumenten und Bauchhöhle hatte, stützen diese These (Lauroy 1994, Schaeff 1998b). Dabei sind insbesondere die Auswirkungen auf Proliferation und Stoffwechsel der Tumorzellen, lokale Traumata und Milieuveränderungen des Peritoneums, Reaktionen des lokalen und systemischen Immunsystems, Wundverhältnisse an den Trokarstellen und Faktoren der Gasinsufflation wie Druck, Art des Gases, Luftfeuchte und Temperatur zu untersuchen (Abbildung 1).

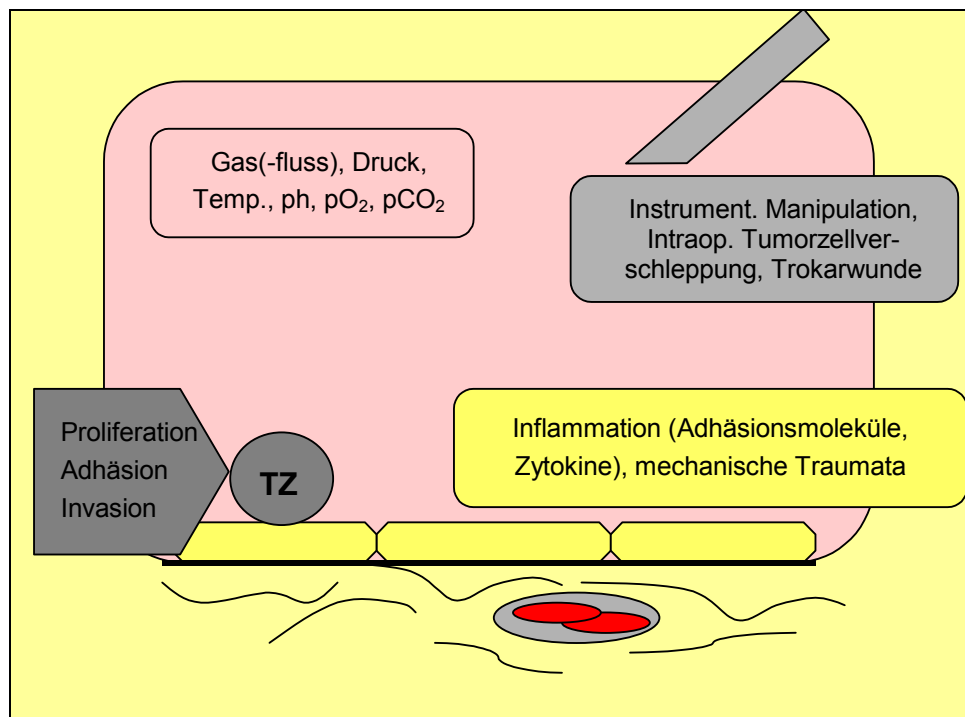


Abbildung 1: Pathophysiologie von Trokarmetastasen und intraperitonealem Tumorwachstum

In einer tierexperimentellen Studie untersuchten Lee et al. das Ausmaß der Metastasierung eines soliden Tumors der Milz nach konventioneller und laparoskopischer Resektion (Lee 1998). Sie stellten zum einen fest, dass eine Verletzung des Tumors unabhängig von der Operationstechnik die Anzahl der Metastasen steigerte. Weiterhin ergab ein Vergleich der beiden Techniken ohne vorherige Manipulation des Tumors einen signifikanten Vorteil der konventionellen Technik. Bei erneuter Durchführung des Versuches konnte jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Anzahl der Metastasen festgestellt werden. Die Autoren führen das letzte Ergebnis auf den Lerneffekt der Operateure zurück. Im ersten Versuch verursachte offensichtlich die durch das Trauma entstandene Streuung der Tumorzellen eine gesteigerte Metastasenbildung. Allardyce et al. wiesen die Verunreinigung von Trokaren und Instrumenten durch Bewegung von Instrumenten, Extraktion von Resektaten und Evakuierung des Pneumoperitoneums in einem Schweinemodell nach (Mathew 1997). In einem ähnlichen Modell senkten Schneider et al. die Inzidenz von Trokarmetastasen nach laparoskopischen Sigmaresektionen von 63 auf 13 % durch protektive Maßnahmen wie Reinigung der Trokare und Inzisionen mit Polyvidonjodid, Verhinderung von Gasleckagen und Fixierung der Trokare (Schneider 1999). Die hier genannten Faktoren sich jedoch nicht spezifisch für die minimal invasive Technik, sondern spielen auch bei konventionellen Operationen eine wesentliche Rolle. So finden sich auch bei offenen Eingriffen freie Tumorzellen in der Bauchhöhle, und das Ausmaß dieser Kontamination hängt selbstverständlich auch bei konventionellen Operationen von der Fertigkeit des Chirurgen ab (Juhl 1994).

Neben der Operationstechnik könnten das Insufflationsgas und der Insufflationsdruck Einfluss auf die Anzahl von Trokarmetastasen und das Ausmaß des intraperitonealen Tumorwachstums haben. Nach intraperitonealer Injektion von Tumorzellen und anschließender Operation zeigte sich in einer tierexperimentellen Arbeit von Allendorf et al. ein größeres intraperitoneales Tumorgewicht nach konventionellen Operationen im Vergleich zur Laparoskopie (Allendorf 1995). In den Versuchen von Mathew et al. war dafür die Anzahl der Trokarmetastasen in bei laparoskopierten Tieren höher als bei konventionell operierten (Mathew 1996). Bouvy et al. wiesen ein geringeres Tumorwachstum nach CO₂-Pneumoperitoneum gegenüber der konventionellen Technik nach, ein weiteres signifikantes Absinken von intraperitonealem Tumorgewicht und

Anzahl der Inzisionsmetastasen wurde zusätzlich durch den Einsatz einer gaslosen Technik erreicht (Bouvy 1996). Jacobi et al. verwendeten zur Etablierung des Pneumoperitoneums bei Ratten Helium als Insufflationsgas und dokumentierten dabei ein geringeres intraperitoneales Tumorwachstum gegenüber der Verwendung von CO₂ (Jacobi 1998b). Die gleiche Arbeitsgruppe stellte fest, dass mit steigendem Insufflationsdruck die Anzahl von Trokarmetastasen und das intraperitoneale Tumorgewicht anstiegen, obwohl ein hoher Umgebungsdruck in vitro das Wachstum der gleichen Tumorzellen hemmte (Jacobi 1998c). Die Ergebnisse der Tierexperimente mit Kleinnagern legen also nahe, dass ein niedriger Insufflationsdruck bzw. die gaslose Laparoskopie sowie die Verwendung von Helium Vorteile gegenüber einer Laparoskopie mit CO₂ zeigen könnten. Jedoch ist zu beachten, dass das Anheben der Bauchdecke eines Kleinnagers gegenüber der des Menschen erheblich weniger Kraftaufwand benötigt, und dass das Einbringen entsprechender Gerätschaften in die Bauchhöhle des Menschen Traumata verursachen könnte, die eine lokale Metastasierung begünstigen. Helium als Insufflationsgas ist trotz seiner geringeren pulmonalen Nebenwirkungen bisher nicht in breitem klinischen Gebrauch wegen der hohen Kosten und der – wahrscheinlich unbegründeten – Angst vor Gasembolien (1.1.4). Prinzipiell ist zu diesen Kleinnagermodellen anzumerken, dass die intraperitoneale Injektion größere Mengen von Tumorzellen (ca. 10⁵/ Tier) wahrscheinlich nicht der Realität entspricht. Das schlägt sich u.a. in der sehr hohen Rate von Metastasen (teils 100 %) und den unterschiedlichen Wachstumsmustern der Metastasen nieder. Während klinisch Trokarmetastasen als Knoten im Bereich der Inzisionsnarben auffielen, zeigte sich in der Bauchhöhle der Versuchstiere häufig eine diffuse Peritonealkarzinomatose.

Einen Einfluss auf das intraperitoneale Milieu ist nicht nur den Insufflationsgasen und Drücken zuzuweisen, sondern auch der herrschenden Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Hinweise darauf ergeben sich aus Versuchen von Puttick et al., die dokumentieren, dass intraperitoneales Tumorwachstum nach Laparotomien bei warmer und befeuchteter Umgebungsluft geringer ausfällt als bei normaler Raumluft (Puttick 1999a). Arbeiten über den Zusammenhang von Temperatur, Gasinsufflation und Tumorwachstum bei Pneumoperitoneum liegen nicht vor.

Eine weitere Möglichkeit der mechanischen Tumorzellausbreitung könnte durch den Aerolisation der Zellen und Verschleppen durch den Gasfluss entstehen. Dieser sogenannte Chimney-Effect konnte jedoch bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (Whelan 1996).

Die direkten Auswirkungen von Insufflationsgas und –druck auf die Proliferation und den Stoffwechsel von Tumorzellen war Gegenstand weiterer Studien. Jacobi et al. berichteten über eine Stimulation des Wachstums von Kolonkarzinomzellen in vitro, ex vivo und in vivo durch Kohlendioxid.; dagegen konnte für Helium ein supprimierender Effekt auf das Wachstum der Zellen nachgewiesen werden (Jacobi 1997c). Die Erhöhung des Umgebungsdrucks in vitro wirkte proliferationshemmend auf eine Kolonkarzinomzellreihe (Jacobi 1998c). In einer Studie von Basson et al. führte eine Erhöhung des Umgebungsdrucks zu einer verstärkten Adhäsion von Karzinomzellen an eine artifizielle Basalmembran (Basson 2000). Puttick et al. stellten fest, dass Kolonkarzinomzellen nach Inkubation mit Helium oder Kohlendioxid eine künstliche Basalmembran eher durchdringen als nach Inkubation mit Luft (Puttick 1999b). Adhäsion und Invasion, essentielle Schritte der Metastasierung, erscheinen demnach durch ein Pneumoperitoneum stimuliert. Wildbrett et al. demonstrierten zudem Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes und Ca^{2+} -Stoffwechsels infolge der Inkubation mit Helium und CO_2 , die Auswirkungen auf Zellfunktion, Proliferation und Apoptose haben könnten (Wildbrett 2002). Kuntz et al. beschrieben ebenfalls eine starke intraperitoneale Azidose infolge eines Kapnoperitoneums (Kuntz 2000). In einer klinischen Studie konnte dahingegen eine peritoneale Azidose nur zu Beginn laparoskopischer Operationen nachgewiesen werden, nach 20 Minuten hatte sich der pH-Wert wieder normalisiert (Neuhaus 2001b). Die Autoren führen das Wiederansteigen des pH-Wertes auf die kontrollierte Hyperventilation der Patienten zurück.

Die mit dem operativen Verfahren verbundenen Änderungen des intraperitonealen Milieus könnten mit Alterationen des Bauchfells einhergehen, die im weiteren eine intraperitoneale Metastasierung begünstigen. Kopernik et al. zeigten eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität und Zytokinausschüttung der Mesothelzellen nach Einwirkung von CO_2 bei erhöhtem Umgebungsdruck (Kopernik 1998). In einer klinischen Studie zeigten Sendt et al. eine Zunahme der Expression des

Adhäsionsmoleküls ICAM-1 im Verlauf konventioneller und laparoskopischer Operationen (Sendt 1999). Aus diesen Veränderungen ließen sich keine Rückschlüsse auf eine Förderung der Metastasenbildung ziehen. Volz et al. jedoch dokumentierten anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine Beeinträchtigung der Morphologie des Peritoneums im Sinne einer Peritonitis (Volz 1999a, 1.3.3). In einem weiteren Versuch kam es nach intraperitonealer Injektion von Tumorzellen und Applikation eines CO₂-Pneumoperitoneums zu einer diffusen Peritonealkarzinomatose (Volz 1999b), während nach einfacher Injektion der Tumorzellen in die Bauchhöhle lediglich einzelne Tumorknoten zu beobachten waren, d.h. das Kapnoperitoneum resultierte in einer starken Schädigung des Bauchfells und begünstigte die nachfolgende Ausbreitung der Tumorzellen. Ob es im Rahmen von konventionellen chirurgischen Operationen zu ähnlichen Veränderungen des Peritoneums kommen könnte, hat die o.g. Arbeitsgruppen nicht untersucht.

Die im Vergleich zu konventionellen Operationen geringere Immunsuppression nach minimal invasiven Eingriffen könnte sich auch in einer besser erhaltenen lokalen Tumorabwehr widerspiegeln. Tatsächlich bestätigen experimentelle Studien eine geringere Funktionseinschränkung von Peritonealmakrophagen nach laparoskopischen Verfahren (Collet 1995, Daphan 1999). Ob dieses Phänomen in eine effektivere lokale Bekämpfung maligner Zellen mündet, muss noch durch weitere Studien geklärt werden.

Eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung spielten weiterhin die Freisetzung von Zytokinen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Freilegung von Proteinen der extrazellulären Matrix im Wundbereich von Inzisionen und intraperitonealen Traumata. Aus der konventionellen Chirurgie ist bekannt, dass lokale Heilungsprozesse die Adhärenz und das Wachstum von Tumorzellen beeinflussen und fördern (Skipper 1989). In Tiermodellen zur Erforschung der Zusammenhänge zwischen Pneumoperitoneum und Metastasen an Trokareinstichstellen konnte nachgewiesen werden, dass eine Manipulation im Bereich der Trokare zu einer Erhöhung der Rate von Inzisionsmetastasen führte (Jacobi 1997c, Aoki 1999). Weiterhin entstanden intraperitoneale Metastasen bevorzugt an Orten durch Schnitt oder Elektrokauter verletzten Peritoneums. Eine einfache Naht senkte dabei die Entstehungsrate von Absiedlungen um bis zu 60 % (Aoki 1999).

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurden zur Vermeidung intraperitonealen Tumorwachstums antiadhärente und zytotoxische Substanzen zur peritonealen Lavage eingesetzt. Die Instillation des antiadhärenten Heparins führte im Tiermodell zu einer signifikanten Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums (Goldstein 1993). Durch Applikation von zytotoxischem PVP-Jod konnte ebenfalls eine Verringerung des Tumorwachstums und eine Abnahme der Trokarmetastasen erreicht werden, als Nebenwirkung kam es jedoch zur Bildung ausgeprägter Adhäsionen (Jacobi 1999a). Andere Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid waren auch wirksam, können wegen gravierender Nebenwirkungen aber nicht empfohlen werden (Goldstein 1993). Taurolin, ein Derivat der Aminosäure Taurin, wird zur peritonealen Lavage bei der Peritonitisbehandlung eingesetzt. Es hemmt die IL-1 β Produktion von Monozyten und wirkt antiadhärent (Blenckharn 1988, Bedrosian 1991). In vitro hemmte es außerdem direkt das Wachstum von Tumorzellen (Jacobi 1997a). Die Lavage mit einer Kombination von Heparin und Taurolin hatte eine synergistische supprimierende Wirkung auf das intraperitoneale und extraperitoneale Tumorwachstum im Tierversuch (Jacobi 1997a).

1.3 Morphologische Studien des Peritoneums

1.3.1 Morphologie des Peritoneums bei Ratte und Mensch

Das Peritoneum kleidet die Bauchhöhle aus. Es setzt sich aus einem einschichtigen Epithel, einer Basallamina und dem submesothelialen Bindegewebe zusammen (Dizerega/Rodgers 1992).

An der peritonealen Oberfläche fanden sich bei elektronenmikroskopischen Studien des Bauchfells von Kleinnagern kubische oder flache mesotheliale Zellen. Das viszerale Peritoneum bestand hauptsächlich aus kubischem Mesothel, das Peritoneum der parietalen Bauchwand dagegen größtenteils aus flachen Zellen. Kubische Mesothelzellen besaßen eine abgerundete apikale Zellkontur und einen dichten Mikrovillisaum. Tiefe Furchen kennzeichneten die Zellgrenzen. Desmosomen und Tight Junctions bildeten die interzellulären Verbindungen. Zellorganellen waren gut entwickelt und in hoher Anzahl vorhanden. Die flachen Mesothelzellen waren ebenfalls im Besitz eines Mikrovillibesatzes und die Art der interzellulären Verbindungen

entsprach dem des kubischen Mesothels. Die Zellgrenzen hingegen waren nur schwer oder gar nicht erkennbar. Die Zellen besaßen außerdem ovale, längliche Kerne, wenig Zytoplasma und eine geringe Menge an Zellorganellen. (Barberini 1977, Michailova 1999)

Jonecko untersuchte Biopsate humanen Peritoneums, die während abdomineller Eingriffe gewonnen worden waren, und beschrieb zwei Formen von Mesothelzellen: „...große flache Mesothelien von etwa hexagonaler Gestalt, und kleinzellige Mesothelien, von sphäroider Form...“ (Jonecko 1990). Es überwogen die flachen Mesothelzellen, die sphäroiden Zellen waren darin felderförmig eingebettet. Ultrastrukturelle Unterschiede wurden nicht benannt, eine Zuordnung zu parietalem oder viszeralem Peritoneum erfolgte nicht. Es ließen sich alle bekannten Zellorganellen nachzuweisen, aber in geringerer Anzahl und dürftigerer Ausprägung. Die Oberfläche des humanen Peritoneums kennzeichnete ein variabler Mikrovillibesatz. Zellgrenzen waren in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen schwer auszumachen. Untersuchungen von Henderson ergaben, dass Mesothelzellen von apikal nach distal durch Tight Junctions, Desmosomen und Interdigitationen der Zellmembran miteinander verbunden bzw. verwoben waren (Henderson 1987). Dobbie beschrieb die Aufsicht auf das menschliche Peritoneum als Mosaik polygonaler Zellen. Nach licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bezeichnete er die Form des Mesothels als flach; kubische Zellen deutete er als Hinweis auf pathologische Veränderungen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentierten einen gut entwickelten Zellorganellapparat (Dobbie 1989).

Die Untersuchungen zeigen, dass die Morphologie des menschlichen Peritoneums der parietalen Bauchwand trotz einiger Abweichungen im Wesentlichen mit der der Ratte übereinstimmt. Das Mesothel des parietalen Peritoneums ist größtenteils ein einschichtiges Plattenepithel, das eine kontinuierliche Schicht bildet. In der Aufsicht erkennt man ein Mosaik polygonaler Zellen. Die peritonealen Deckzellen sind von Mikrovilli bedeckt. Die Zellgrenzen lassen sich nur schwer festlegen. Die interzellulären Verbindungen bestehen aus Tight Junctions und Desmosomen. Das sich der Basallamina anschließende submesotheliale Bindegewebe setzt sich aus Kollagenfasern, Fibroblasten und freien Zellen (Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten) zusammen. Es enthält Lymph- und Blutgefäße. Stomata sind runde oder

ovale Öffnungen der Mesothelzellschicht, die eine Verbindung zwischen den Lymphabflusswegen des Peritoneums und der Bauchhöhle herstellen. Mesothel und Endothel stoßen hier aneinander und besitzen die gleiche Basalmembran. Teilweise werden die Stomata von Mesothelzellen überlappt oder von Zelltrümmern ausgefüllt. Sie dienen dem Transport von Flüssigkeiten und zellulärem Material. (Michailova 1999, Jonecko 1990)

1.3.2 Veränderungen der Morphologie des Peritoneums nach Einwirkung unterschiedlicher Noxen

Im Rahmen der Erforschung von Barium-induzierter oder bakterieller Peritonitis, Peritonealdialyse, Implantation von Kathetern zur intraperitonealen Chemotherapie und Peritonealkarzinomatose wurden in der Vergangenheit Untersuchungen der Morphologie des Peritoneums und seiner Veränderungen unter pathologischen Bedingungen unternommen.

Watters und Buck entfernten bei Ratten mechanisch das Mesothel des parietalen Peritoneums und beobachteten rasterelektronenmikroskopisch die Regenerationsvorgänge. Die nun freiliegende Basalmembran war innerhalb von acht Stunden von Rundzellen bedeckt. Es kam zu einer starken mitotischen Aktivität des umliegenden Mesothels. Neugebildete Mesothelzellen ersetzten die temporäre Zelldecke aus Rundzellen nach 3-5 Tagen (Watters/Buck 1972). Haney wies nach, dass es sich bei diesen Rundzellen um Makrophagen handelte (Haney 2000, Raz 1976). Er verletzte das Peritoneum von Mäusen mit einem Skalpell und injizierte ihnen intraabdominell Polystyrolkugeln, um anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen Makrophagen am Ort der Verletzung eindeutig nachweisen zu können. Nach 24 Stunden waren an der Oberfläche der traumatisierten Stelle ausschließlich Makrophagen nachweisbar. Zwei Tage später beobachtete er dort auch Mesothelzellen. Guo et al. implantierten Ratten Fremdkörper aus Silikon oder Gummi in das untere Abdomen und entnahmen im Verlauf von vier Stunden bis 21 Tagen Biopsien des parietalen Peritoneums zur histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung. Sie beschrieben Separation und Ablösung von Mesothelzellen, Leukozyteninfiltration und Ödem des submesothelialen Bindegewebes sowie Fibrinbeläge und Monozyten auf der freigelegten Basalmembran innerhalb der ersten vier Tage. Nach 21 Tagen war die normale histologische Architektur wiederhergestellt (Guo 1993).

Die Kontamination der Bauchhöhle mit Stärke verursachte bei Ratten innerhalb von vier Stunden eine Abkuglung und Separation der Mesothelzellen, dabei verblieben einige Zellbrücken. Zwischen den Zellen war die Basallamina deutlich sichtbar. Nach vier Tagen wurde wieder ein intaktes Mesothel vorgefunden. Auf der Oberfläche und zwischen den Deckzellen zeigten sich Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, die auch in der Peritonealflüssigkeit nachgewiesen wurden, die Alterationen der Mesothelzellen führte der Autor auf eine aktive Zellkontraktion zurück (Kaufman 1982). Henrich provozierte eine Bariumperitonitis bei Ratten und beschrieb anhand von elektronenmikroskopischen Bildern Mesothelzellseparation mit Freilegung der Basalmembran und großflächige Fibrinauflagerungen des Peritoneums in Form von dicken, durchlöcherten Platten oder dreidimensional aufgespannte spinnengewebsartige Fibrinfäden (Henrich 1986).

Kimura et al. injizierten Ratten den Überstand zentrifugierten kanzerösen Aszites (zellfrei) in die Bauchhöhle und betrachteten nach 24 Stunden entnommene Proben des Peritoneums mit einem Rasterelektronenmikroskop. Die Mesothelzellen waren abgerundet und vollständig voneinander getrennt. Die Anzahl der Mikrovilli war verringert und ihre Länge verkürzt. Außerdem wurde eine massive Zellproliferation festgestellt (Kimura 1985). Lethola et al. verursachten eine hämorrhagische Pankreatitis bei Schweinen und applizierten deren Aszites weiteren Tieren. Eine, drei und fünf Stunden später wurden Biopsate des Peritoneums gewonnen und untersucht. Lichtmikroskopisch imponierten Vaskularisation, Ödem und schwere Leukozyteninfiltration des subserösen Bindegewebes. Das Mesothel wurde von einer Schicht aus Fibrin und Entzündungszellen bedeckt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten sowohl eine Verringerung und Verformung der Mikrovilli als auch eine Separation und Ablösung der Deckzellen, die zur Freilegung der Basallamina führten (Lethola 1986).

In einem in vitro Versuch ergaben sich durch Zugabe von aktivierten neutrophilen Granulozyten innerhalb von fünf Stunden Retraktion und Separation von kultivierten humanen Mesothelzellen (Andreoli 1994). Ebenso verhielten sich die peritonealen Deckzellen von Ratten, denen Buck Tumorzellen intraperitoneal injizierte. In den ersten drei Tagen konnten keine Veränderungen am Mesothel festgestellt werden, am vierten und fünften Tag kam es dann zur Abrundung und Separation der Mesothelzellen (Buck

1973). Ein ähnlicher Versuch von Birbeck et al. führte bei Mäusen am siebten Tag zu Abrundung und Separation der Deckzellen. Einen Tag darauf hafteten Tumorzellen auf der freiliegenden Basalmembran und drangen am neunten Tag in diese ein. Noch vor der Reaktion des Mesothels zeigte sich in histologischen Präparaten Leukozyteninfiltration und Ödem des submesothelialen Gewebes (Birbeck/Wheatley 1965).

In der Arbeit von Kaufman war eine bakterielle Peritonitis außer durch eine Separation und Abkugelung der Mesothelzellen zusätzlich durch Vaskularisation, schwere Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und Ödem des submesothelialen Gewebes gekennzeichnet. Charakteristisch für die bakterielle Infektion war weiterhin ein auf den Deckzellen gelegenes Fibrinnetzwerk. In den Spalten zwischen den Zellen lagerten Entzündungszellen. Am vierten Tag war kein intaktes Mesothel mehr zu erkennen (Kaufman 1982). Die gleichen Ergebnisse dokumentierten Verger et al. Außerdem beschrieben sie zum einen den Erhalt von Interzellularbrücken bei der Separation des Mesothels und zum anderen dessen Ablösung als Folge einer bakteriellen Infektion (Verger 1983). Bloechle zeigte, dass aus einer perforationsinduzierten Peritonitis bei Ratten innerhalb von zwölf Stunden neben Veränderungen des Mesothels zusätzlich eine Verringerung und Deformation der Mikrovilli sowie eine Öffnung der peritonealen Stomata resultierte (Bloechle 1999).

Im Rahmen der Peritonealdialyse und Peritonitisbehandlung entstanden Arbeiten zu morphologisch fassbaren entzündlichen Veränderungen des menschlichen Peritoneums. Die morphologischen Befunde waren mit den im Tierversuch provozierten Veränderungen identisch (Jonecko 1990, Dobbie 1989, Henderson 1987). Jonecko unterschied in diesem Zusammenhang einen Reizzustand des Peritoneums mit Abkugelung und unvollständiger Separation des Mesothelzellen von der eigentlichen Peritonitis, die durch Zerstörung des Mesothels, einer massiven Leukozytenmigration und schwammartigen Fibrinbelägen charakterisiert war. Eine Vermehrung der Mesothelzellen pro Flächeneinheit, eine Fibrose des submesothelialen Gewebes und eine Verringerung der Anzahl der Mikrovilli galten Dobbie als Kennzeichen einer chronischen Schädigung.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Morphologie des Peritoneum sich nach Einwirkung physikalischer, chemischer, immunologischer oder bakterieller Noxen im Sinne einer Entzündungsreaktion verändert. Diese Reaktionsmuster scheinen von der Art der Noxe unabhängig zu sein (Lierse 1985, Kaufman 1982, Jonecko 1990). Insbesondere finden sich Alterationen der Deckzellen, Fibrinbeläge auf dem Mesothel, Infiltration des Peritoneums durch Entzündungszellen sowie Vaskularisation und Ödem des subserösen Bindegewebes. Erste morphologische Veränderungen der Oberfläche wie Retraktion und Abkugelung der Mesothelzellen sind dabei schon innerhalb der ersten Stunden nach Applikation der Noxe zu beobachten und erreichen ihren Höhepunkt etwa nach 24h. Eine leukozytäre Infiltration des Peritoneums wurde nach etwa 6-12h beschrieben und erreichte nach ca. 24-48h ihr maximales Ausmaß. Die Regeneration des Peritoneums nahm mindestens 4-5 Tage in Anspruch.

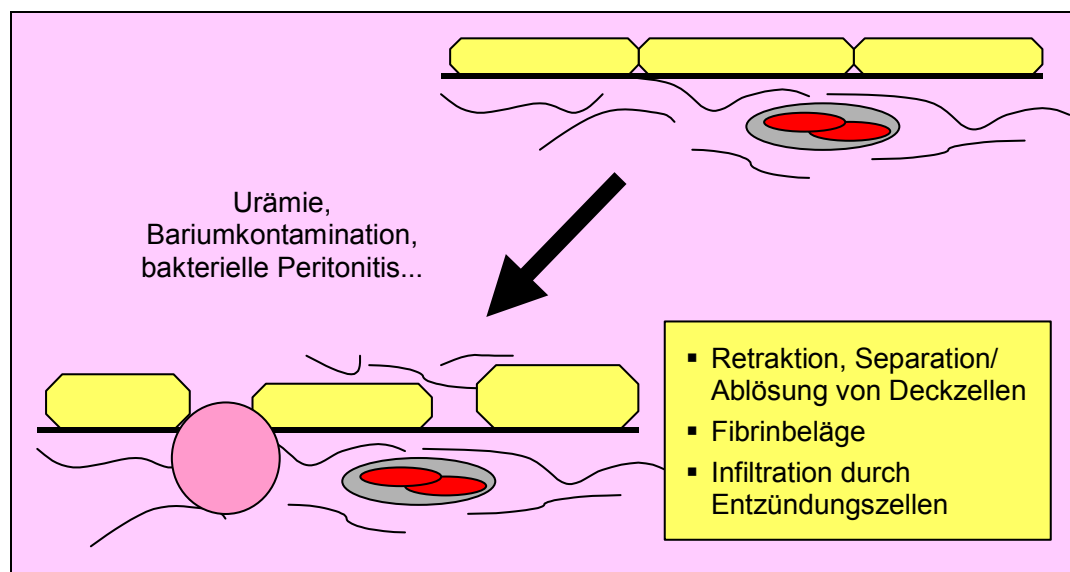


Abbildung 2: Entzündliche Veränderungen des Peritoneums

1.3.3 Studien zur Morphologie des Peritoneum nach Pneumoperitoneum

Zu diesem Zeitpunkt liegen eine Reihe von tierexperimentellen und klinischen Studien vor, die sich mit den Zusammenhängen von Pneumoperitoneum und Tumorwachstum befassen (1.2.2). Darunter befinden sich auch einzelne, die sich mit den Auswirkungen der Operationstechnik auf die Morphologie des Peritoneums beschäftigen.

Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen dokumentierten Volz et al. eine deutlich erkennbare Entzündung des Peritoneums von Mäusen als Folge eines CO₂-Pneumoperitoneums und die nachfolgende Regeneration (Volz 1999a). Nach zwei Stunden waren Retraktion und Separation des Mesothels zu erkennen, Makrophagen erschienen auf der freigelegten Basalmembran. Die Alterationen des Mesothels und dessen Infiltration durch Makrophagen und Lymphozyten erreichten ihr größtes Ausmaß nach 12 bis 24 Stunden; daraufhin zeigten sich Zeichen einer Regeneration, die nach 96 Stunden abgeschlossen war. In einem weiteren Versuch wurden zusätzlich maligne Zellen intraperitoneal eingebracht. Es kam bei der Kombination von Pneumoperitoneum und Tumorzellinjektion innerhalb der ersten zwei Tage zu den erwähnten entzündlichen Veränderungen und danach zu einer diffusen Peritonealkarzinomatose, während eine alleinige Applikation der Zellen ohne CO₂-Pneumoperitoneum ein knotenförmiges Tumorwachstum auf der Mesotheloberfläche verursachte (Volz 1999b). Die Befunde zeigten sich bei allen Tieren und betrafen das ganze Peritoneum. Eine Kontrollgruppe bzw. eine Laparotomiegruppe wurde allerdings nicht untersucht.

Suematsu et al. untersuchten ebenfalls rasterelektronenmikroskopisch die Auswirkungen des Pneumoperitoneums auf das Bauchfell von Mäusen (Suematsu 2001). Sie verwendeten Luft, CO₂ und Helium als Gase und verglichen die Ergebnisse mit denen der Laparotomie. Infolge der Laparoskopie traten nach CO₂-Pneumoperitoneum eine Retraktion der Mesothelzellen, nach Helium-Pneumoperitoneum eine Separation der Mesothelzellen und nach der Laparotomie eine Ablösung der Deckzellen auf. Suematsu et al. bezeichneten die Veränderungen nach Laparoskopie und Laparotomie als morphologisch „unterschiedlich“ und vermuteten unterschiedliche pathophysiologische Folgen der verschiedenen Operationstechniken bzw. Gase als Ursache dieser Differenzen.

In einer Studie von Bloechle et al. führte eine Peritonitis innerhalb von zwölf Stunden zu deutlichen entzündlichen Veränderungen des Peritoneums von Ratten (Bloechle 1999). Durch Applikation eines Pneumoperitoneums wurde die Peritonitis weiter verstärkt. Es kam zur Ablösung der Mesothelien, Adhäsion von Makrophagen und Deformation der Mikrovilli. Die ausschließliche Applikation eines Pneumoperitoneums

resultierte lediglich in Aufrichtung der Mikrovilli und Faltenbildung des intakten Mesothels.

Den Einfluss von Temperatur und Wassergehalt des Insufflationsgases auf die Bauchfellmorphologie betrachteten Hazebroek et al. rasterelektronenmikroskopisch bei Ratten (Hazebroek 2002). Das Peritoneum aller Tiere zeigte unabhängig von Temperatur und Insufflationsgasfeuchtigkeit Alterationen: Im Verlauf von 24h nach Applikation des Pneumoperitoneums kugelten sich die Mesothelzellen ab und die Basallamina wurde sichtbar. Diese Veränderungen traten allerdings auch in der Gruppe auf, die einer gaslosen Laparoskopie unterzogen wurde.

Die einzige Arbeit, die Veränderungen des menschlichen Bauchfells beschreibt, stammt von Schaeff et al. (Schaeff 1998a) Separation und Retraktion des Mesothels, Leukozyteninfiltration und Ödem des submesothelialen Bindegewebes finden sich im Verlauf der ersten Stunden laparoskopischer Operationen. In Proben von Patienten, die laparotomiert oder mittels gasloser Laparoskopie operiert wurden, konnten diese Befunde „nicht regelhaft und in dieser Ausprägung beobachtet werden“ (Schaeff 1998a). Die Ergebnisse der Studie sind jedoch eher kritisch zu betrachten, da die Biopsien nicht standardisiert entnommen wurden und weiterhin nicht deutlich wird, wie viele Patienten untersucht wurden, Schaeff et al berichteten lediglich, sie hätten insgesamt 36 Biopsate untersucht.

In den vorliegenden Studien fanden sich sowohl nach Laparotomie als auch nach Laparoskopie morphologische Veränderungen des Peritoneums. Die Arbeiten von Volz, Schaeff und Suematsu zeigen Veränderungen des Mesothels infolge eines Pneumoperitoneums im Sinne einer Peritonitis. Bloechle beschreibt hingegen nach Applikation eines Pneumoperitoneums lediglich Veränderungen der Mikrovilli. In den Untersuchungen von Suematsu und Schaeff nach Laparotomien ergaben sich morphologische Veränderungen des Peritoneums, die im Vergleich bei der Laparotomie als geringfügiger eingestuft wurden.

2 Herleitung der Fragestellung und Planung des Experiments

In der kurzen Zeit seit ihrer Einführung hat sich die laparoskopische Chirurgie fest etabliert und in ihrem Indikationsspektrum erheblich erweitert. Bessere kosmetische Ergebnisse und Vorteile in der postoperativen Phase sind gegenüber den konventionellen chirurgischen Verfahren nachgewiesen worden. (1.1.3)

Aus diesen Gründen wurden laparoskopische Verfahren auch in der chirurgischen Therapie maligner Tumoren eingesetzt. Dabei könnten die besser erhaltene Immunabwehr und die schnellere Rekonvaleszenz die Absiedlung verbliebener Tumorzellen verhindern bzw. den früheren Einsatz einer Chemo- oder Immunotherapie erlauben. Bedenken gründeten sich bisher u.a. auf die Berichte über Trokarmetastasen und Lokalrezidive. (1.2.1)

Die Pathophysiologie von Trokarmetastasen und intraperitonealem Tumorwachstum wurde noch nicht geklärt. Grundsätzlich wurden bisher für diese Phänomene Eigenschaften der Operationsverfahren und instrumentelle Manipulation am Tumor verantwortlich gemacht. Tierexperimentelle Daten legten nahe, dass CO₂ – das bei der Laparoskopie fast ausschließlich verwendete Gas – intraperitoneales Tumorwachstum begünstigen könnte. Dabei wurde gezeigt, dass CO₂ eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Tumorzellen entfalten kann. Im Rahmen der Laparoskopie könnte ein CO₂-Pneumoperitoneum aber auch eine direkte Schädigung des Bauchfells hervorrufen und so die Adhäsion und Einnistung von Tumorzellen erleichtern. Dabei muss u.a. das verwendete Gas als Einflussgröße hinzugezogen werden.

Deshalb sollten in dieser Studie folgende Fragen geklärt werden:

1. Welchen Einfluss hat ein Pneumoperitoneum auf das Bauchfell und gibt es dazu ein morphologisches Korrelat?
2. Verändern sich die Adhäsion und Einnistung von Tumorzellen an das Peritoneum durch ein Pneumoperitoneum?
3. Welchen Einfluss hat die Verwendung unterschiedlicher Insufflationsgase auf das Peritoneum und die Tumorabsiedlung? Existiert hierzu ein morphologisches Korrelat?

Dazu sollten die Auswirkungen eines Pneumoperitoneums auf die Struktur des Peritoneums rasterelektronenmikroskopisch erforscht werden.

Eine Untersuchung des menschlichen Bauchfells schied aufgrund ethischer und praktischer Überlegungen aus. So ließen sich eventuell Proben des Bauchfells während Operationen gewinnen, eine Eröffnung der Bauchhöhle zu einem definierten späteren Zeitpunkt zur Entnahme von Biopsien kam jedoch unter keinen Umständen in Frage. Die Einhaltung standardisierter Bedingungen hinsichtlich Insufflationsdruck, -gas und -dauer erschien nicht möglich. Angesichts der lokalen und systemischen Auswirkungen von Insufflationsgas bzw. -druck wurde ebenfalls von einem *in vitro* Versuch abgesehen (1.1.3). Vorhandene Modelle zur *in vitro* Untersuchung des Mesothels berücksichtigten nicht die Veränderungen von pH-Wert, Durchblutung sowie lokalem und systemischen Immunparametern (Koks 2000 , Andreoli 1994).

In der Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie der Charité existiert ein etabliertes Rattentumormodell zur Erforschung der Zusammenhänge zwischen Pneumoperitoneum und Tumorstadium (Jacobi 1997c, Jacobi 1998c, 3.1.1). Außerdem entspricht die Morphologie des Peritoneums der Ratte weitgehend der des Menschen (1.3.1). Die Einwirkung unterschiedlicher Noxen auf das Peritoneum ruft eine stereotype Entzündungsreaktion desselben hervor (1.3.2). Sollte ein Pneumoperitoneum – wie andere Studien zeigen (1.3.3) – das Bauchfell schädigen, sind typische Alterationen zu erwarten, die sich rasterelektronenmikroskopisch erfassen lassen (1.3.2). Weiterhin müsste eine Beeinträchtigung des Peritoneums ein globales Phänomen sein und

entsprechende Befunde nahezu an jeder Lokalisation zu finden sein, da sowohl Gas als auch Druck an jedem Ort den gleichen Wirkungsmechanismus entfalten.

Aus diesen Gründen wurde folgendes Vorgehen festgelegt: Verwendung des etablierten Tumormodells, Injektion von Tumorzellen in die Bauchhöhle der Ratten, Aufbau eines Pneumoperitoneums mit unterschiedlichen Insufflationsgasen und standardisiertem Insufflationsdruck, Entnahme von Biopsien des Peritoneums nach einer definierten Zeit und anschließende rasterelektronenmikroskopische Untersuchung dieser Proben.

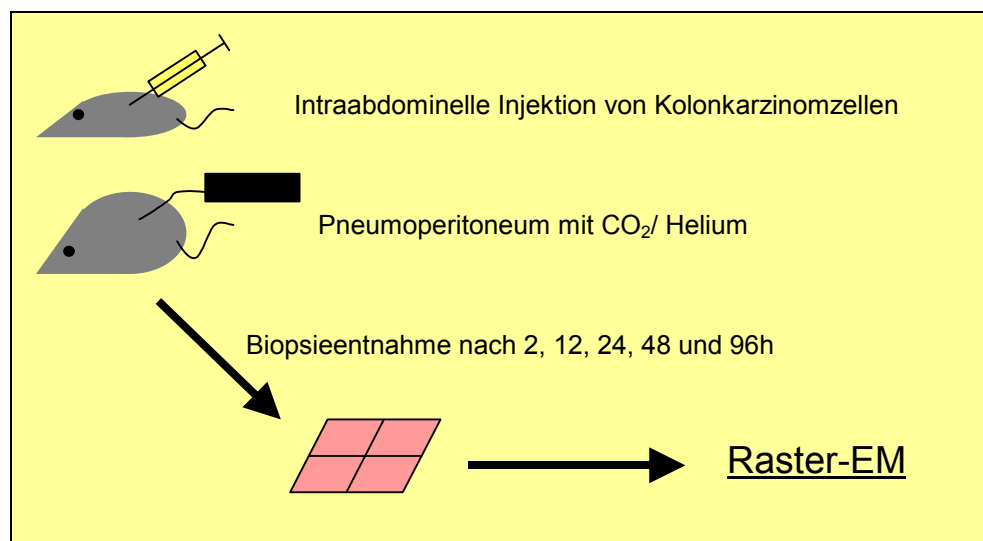


Abbildung 3: Versuchsaufbau

Da davon ausgegangen werden konnte, dass der Aufbau eines Pneumoperitoneums einen Einfluss auf die Struktur des Peritoneums hat (1.3.3), sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Der Aufbau eines Pneumoperitoneums mit dem Insufflationsgas CO₂ und einem Insufflationsdruck von 15 mm Hg führt zu entzündlichen Veränderungen des Mesothels.
2. Der Aufbau eines Pneumoperitoneums mit dem Insufflationsgas Helium und einem Insufflationsdruck von 15 mm Hg führt zu entzündlichen Veränderungen des Mesothels.
3. Der Aufbau eines Pneumoperitoneums mit dem Insufflationsgas CO₂ führt zu stärkeren Veränderungen des Peritoneums als der Aufbau eines Pneumoperitoneums mit dem Insufflationsgas Helium.

3 Material und Methodik

3.1 Tierexperiment

3.1.1 Tierart und Tumorzelllinie

In der vorliegenden Studie wurde als Tierart eine BD IX Ratte (Charles River, Deutschland) und als Tumorzelllinie ein Adenokarzinom des Kolons DHD/K12/TRb (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England) verwendet. Diese Kombination hat den Vorteil, dass Ratte und Tumorzelllinie den gleichen MHC-Haplotyp tragen und dadurch eine Abstoßung der allogenen malignen Zellen verhindert wird. Dieses Tumormodell wurde in der Vergangenheit problemlos und erfolgreich von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Laparoskopie und Tumorabsiedlung eingesetzt (Jacobi 1998a, Jacobi 1999a, McCourt 2000). Außerdem entspricht die Morphologie des Peritoneums der Ratte weitestgehend der des menschlichen Peritoneums (1.3.1).

Die BD IX Ratten wurden eigens für Tierversuche gezüchtet. Alle Tiere waren männlich und wogen zum Zeitpunkt des Experiments 250-300g. Zwischen Lieferung und Experiment vergingen mindestens 10 Tage, um die Tiere zu beobachten und an die Umgebung zu gewöhnen. Die Tiere wurden unter Standardlaborbedingungen gehalten. Vor und nach der Untersuchung hatten sie freien Zugang zu Wasser und Nahrung.

Die Karzinomzellen wurden als Zellsuspension in tiefgefrorenem Zustand geliefert. Die Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Nach Überführung in das Nährmedium (1:1 Dulbeccos mem und Hams F 10 Medium, beide Biochrom, Deutschland) erfolgte die Vitalitätsprüfung mittels Acridine-Orange-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie. Danach wurde die Zellsuspension fünf Minuten mit 200 g zentrifugiert und in das Medium resuspendiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank in einer Kulturflasche (75cm²/ 250ml) bei 37°C und einer CO₂ Konzentration von 5%. Dem Nährmedium wurden vorher 10% fetales Rinderserum, 1000 IU/l Penicillin/Streptomycin (beides Gibco BRL, Deutschland) und 2 mmol/l Glutamin (Biochrom, Deutschland) zugesetzt.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, anschließend 300 µl einer vorgewärmten Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA) hinzugegeben und die Lösung einige Minuten unter dem Mikroskop inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mittels einer sterilen Pipette aufgenommen, mit der doppelten Menge Medium versetzt, bei 200g fünf Minuten zentrifugiert, mit Medium/ Zusatz resuspendiert und in eine neue Kulturflasche pipettiert.

Gleichzeitig wurden von dieser Zellsuspension jeweils Proben à 10^5 Zellen eingefroren. Die Zellen wurden in ein Kryoröhrchen suspendiert, zentrifugiert und nach Abpipettieren des Überstandes in einem Stickstoffbehälter gelagert. Für die Injektion im Tumormodell wurden die Zellen wie oben beschrieben aufgetaut, ihre Vitalität geprüft und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.1.2 Einteilung der Gruppen

Für die Experimente wurden insgesamt 55 Ratten in Abhängigkeit vom verwendeten Gas in zwei Gruppen à 25 Tiere und eine Kontrollgruppe à 5 Tiere unterteilt.

Die Anlage des Pneumoperitoneums erfolgte bei fünf Ratten gleichzeitig, die dadurch eine Kohorte bildeten. Jedes dieser fünf Tiere war der gleichen Gruppe zugeordnet. Für die Biopsieentnahme wurde zum entsprechenden Zeitpunkt eine der Ratten nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und somit einer Untergruppe zugewiesen (Abbildung 4).

Den Kohorten der CO₂-Gruppe wurde zum Zeitpunkt des Experiments je ein Kontrolltier beigeordnet. Es wurden also zu Beginn des Experiments nicht fünf, sondern sechs Tiere ausgewählt, narkotisiert, deren Bauch rasiert und die Tumorzellen appliziert. Das Pneumoperitoneum wurde aber nur bei fünf Tieren aufgebaut. Das zufällig ausgewählte sechste diente als Kontrolltier. Die Biopsieentnahme erfolgte bei dieser Ratte zwei Stunden nach Injektion der malignen Zellen in die Bauchhöhle. Die Untersuchung der Kontrolltiere diente der Gewinnung von Negativkontrollen.

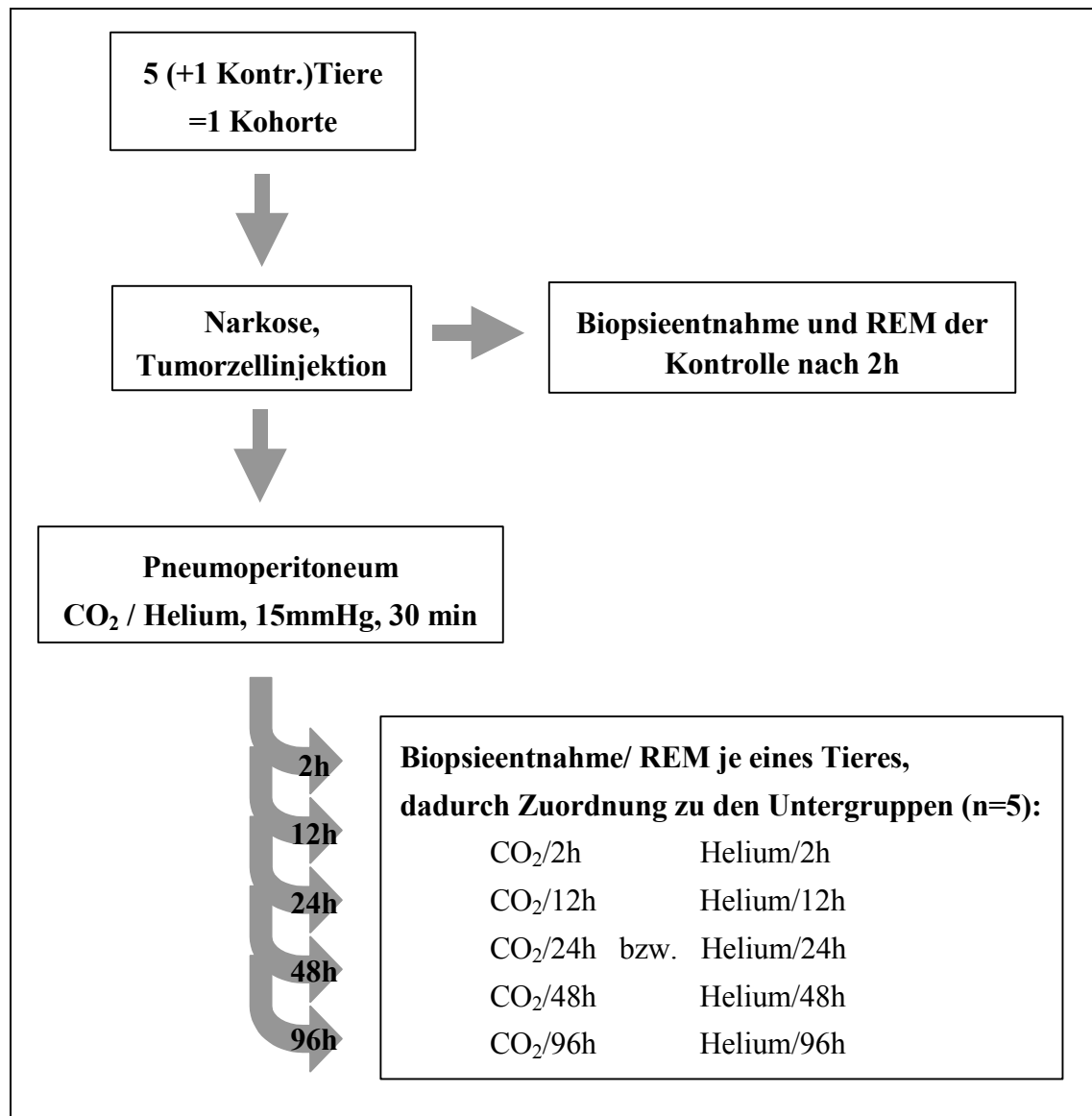


Abbildung 4: Einteilung der Gruppen, Kohorten, Untergruppen

3.1.3 Pneumoperitoneum

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte durch die intramuskuläre Injektion von Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2 %, Bayer Vital GmbH, Deutschland; 10 mg/kg Körpergewicht) und Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®, Serum-Werk Bernburg AG, Deutschland; 80 mg/kg Körpergewicht) in eines der Hinterbeine. Die Spontanatmung blieb während des gesamten Experiments erhalten. Nach Einleitung der Narkose wurde den Tieren der Bauch rasiert und desinfiziert. Daraufhin wurden 10⁵ maligne Zellen mit einer Subkutannadel intraperitoneal injiziert und die Ratten durch eine Stanzmarke am Ohr gekennzeichnet.

Zur Anlage des Pneumoperitoneums wurde die Bauchhöhle der Ratten mit einer Venenverweilkanüle (1,4 mm Durchmesser) punktiert. Unter Zuhilfenahme von Dreiwegehähnen und Plastikschläuchen wurden die fünf Tiere einer Kohorte gleichzeitig an einen Insufflator (Electronic Laparoflator, Karl Stolz GmbH, Deutschland) angeschlossen.

Es folgte der Aufbau des Pneumoperitoneums mit dem entsprechendem Gas und einem Druck von 15 mm Hg. Bei der Verwendung von Helium wurde der Druckminderer gewechselt, so dass gleiche Druckbedingungen herrschten. Nach begonnener Insufflation schwankte der Druck maximal in einem Bereich von ± 2 mm Hg um den Zieldruck. Der anfängliche Gasfluss betrug 1 l/min, der gesamte Gasverbrauch 1,5 \pm 0,3 l. Nach 30 Minuten wurden die Verbindungsschläuche dekonnektiert und die Bauchhöhle desuffliert. Zuletzt wurden die Venenverweilkanülen entfernt und die Ratten in den Tierstall entlassen.

3.1.4 Biopsieentnahme

Die Auswahl der Zeitpunkte zur Probenentnahme resultierte aus Angaben in der Literatur (1.3.2). Nach Einwirkung einer Noxe auf das Mesothel stellten sich in den ersten Stunden morphologische Veränderungen der Zellen ein (Lethola 1986), die nach 12 – 24 Stunden ihren Höhepunkt erreichten (Volz 1999a). Entzündungszellen waren besonders in der ersten beiden Tagen zu beobachten (Dizerega/Rodgers 1992). Die anschließenden Regenerationsvorgänge setzten mit der Entzündung ein und nahmen ca. 3 – 5 Tage in Anspruch (Watters/Buck 1972). (1.3.2)

Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurde ein Tier aus der Kohorte zufällig ausgewählt und durch die intramuskuläre Injektion einer Überdosis Rompun®/Ursotamin® getötet. Der Ratte wurde daraufhin intraperitoneal 10 ml einer Glutaraldehydlösung (GA; 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3) injiziert. Zur Biopsieentnahme wurde zunächst ein medianer Bauchhautschnitt durchgeführt und dann die Haut von der darunter liegenden Muskelschicht abpräpariert. Daraufhin wurde die Bauchhöhle eröffnet und mehrere ca. 1 x 1 cm große Biopsate, bestehend aus dem Peritoneum und der darunter liegenden Muskelschicht, von der parietalen Bauchwand entnommen. Die Gewebeproben wurden mit Nadeln auf einem Korkstück aufgespannt und so für sechs Stunden in einer mit GA gefüllten Schale bei

8°C aufbewahrt. Bei Entnahme der Proben aus den Schalen wurde die dem Peritoneum abgewandte Seite mit einem Faden markiert, um die Seiten nach der eine Schwärzung bewirkenden Postfixierung identifizieren zu können. Darauffolgend wurden die Biopsien in mit GA gefüllte Probentöpfe überführt, in denen sie 24 Stunden kühl gelagert wurden.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie

3.2.1 Technische Aspekte

Das Prinzip der Elektronenmikroskopie entspricht größtenteils dem der Lichtmikroskopie. Anstelle einer Lichtquelle wird eine Elektronenquelle verwendet, zur Fokussierung und Lenkung der Strahlen werden elektromagnetische Felder eingesetzt. Während der Lichtstrahl durch das Auge wahrgenommen wird, werden die Elektronen durch einen Detektor registriert und ein Bild errechnet. Die Vorteile der Elektronenmikroskopie liegen im stärkeren Auflösungsvermögen (ca. 1 nm gegenüber 0,1 µm bei der Lichtmikroskopie), der höheren größtmöglichen Vergrößerung (bis 150.000fach versus ca. 1.000fach) und der größeren Schärfentiefe. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie werden die Proben wie in der Lichtmikroskopie durchstrahlt. Die Bildentstehung der Rasterelektronenmikroskopie beruht auf reflektierten und in der Probe erzeugten Elektronen. Dadurch kann die Oberfläche einer Probe genau beurteilt werden. Die Beobachtung erfordert jedoch eine besondere Vorbehandlung der Biopsate (3.2.2).

Im Rasterelektronenmikroskop (REM) werden Elektronen aus einer Elektronenquelle freigesetzt und durch ein starkes elektrisches Feld in einem Vakuum beschleunigt. Magnetische Felder bündeln und lenken den Elektronenstrahl so, dass die Proben zeilenförmig abgetastet wird. Das Auftreffen der Elektronen auf das Präparat resultiert in Reflektion (Rückstreuelektronen), Absorption mit der Entstehung von Probenstrom oder Freisetzung weiterer Elektronen (Sekundärelektronen). Rückstreu- und Sekundärelektronen werden durch einen Detektor registriert und hieraus ein Bild errechnet. Das Ergebnis wird auf einem Monitor abgebildet und kann photographiert oder digital gespeichert werden.

Das verwendete Gerät war ein DSM 982 Gemini (Zeiss, Deutschland). Der Kathodenstrom betrug 150 mA und die Beschleunigungsspannung 5 kV. Es wurde ein Arbeitsabstand von 10 mm eingehalten. Die Biopsate wurden bei 20 bis 5000facher Vergrößerung standardisiert ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte anhand von Photographien und digitaler Speicherung (3.2.3).

3.2.2 Präparation von Proben und Tumorzellen

Nach der Fixierung in Glutaraldehyd (3.1.4) erfolgte eine Postfixierung mit Osmiumtetroxid (1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3), die eine Stabilisierung und damit geringere Extraktion der Lipide bewirkte. Darüber hinaus wurde durch die Anlagerung von Schwermetall die Leitfähigkeit des Präparats erhöht. Vor und nach der Postfixierung wurden die Proben mit 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,3) gewaschen. (Tabelle 1)

Die Beobachtung im REM erfordert ein Hochvakuum, daher mussten die Proben entwässert und getrocknet werden. Nach der vollständigen Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Proben mit Hexamethyldisilazan (HMDS; Sigma, Deutschland) infiltriert und luftgetrocknet (Bray 1993). Durch seinen geringen Dampfdruck verdampfte HMDS so langsam, dass keine das Gewebe schädigenden Oberflächenspannungen entstanden. Im Anschluss an die Trocknung wurden die Präparate mit Hilfe von Leitsilber auf Probenhalter montiert. (Tabelle 1)

Die getrockneten biologischen Proben hatten durch den Wasserverlust ihre Leitfähigkeit eingebüßt. Darüber hinaus bestanden sie aus leichten Elementen mit einer schlechten Sekundärelektronenemission. Um Aufladungen und thermische Belastungen durch das Elektronenbombardement sowie eine schlechte Sekundärelektronenausbeute zu vermeiden, wurden die Präparate in einer Hochvakuum - Kleinbeschichtungsanlage (MED 020, BAL – TEC AG, Fürstentum Liechtenstein) mit einer dünnen Goldschicht überzogen.

Maligne Zellen wurden mikroskopiert, um sie in den Gewebeproben erkennen zu können. 10^6 maligne Zellen wurden aus dem Medium in Glutaraldehyd überführt und sechs Stunden fixiert. Es erfolgte keine Postfixierung. Die Vorgänge Entwässerung, Trocknung und Beschichtung entsprachen der Behandlung der festen Proben. Zwischen den einzelnen Vorgängen wurde die Tumorzelllösung mit 200g zentrifugiert. Nach der

Infiltration mit HMDS wurden die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert und mit einer kleinen Menge HMDS resuspendiert. Ein Tropfen dieser dicken Suspension wurde auf einem Objektträger aufgebracht und getrocknet.

Fixierungsverfahren haben Einfluss auf Morphologie und Größe von Zellen. Entwässerung und Trocknung führen zu einer Schrumpfung, beispielsweise verringert sich der Durchmesser von Erythrozyten um 25-30 % (Gusnard/Kirschner 1977). Weiterhin kann die Präparation der Proben u.a. durch auftretende Oberflächenspannungen die Morphologie der Zelloberflächen verändern (Virtanen 1984). Größen- und Formveränderungen sind bei der HMDS- und der häufiger verwendeten Kritische-Punkt-Trocknung gleich (Braet 1997).

Tabelle 1: Die einzelnen Präparationsschritte

Vorgang		Zeitdauer
Fixierung und Postfixierung	Fixierung in Glutaraldehyd	6 Stunden
	Waschen mit Phosphatpuffer	2 x 15 Minuten
	Postfixierung mit	2 Stunden
	Osmiumtetroxid	2 x 15 Minuten
	Waschen mit Phosphatpuffer	
Entwässerung mit Ethanol:	70 %	2 x 15 Minuten
	90 %	2 x 15 Minuten
	100 %	2 x 15 Minuten
Trocknung	Infiltration mit HMDS	2 x 15 Minuten
	Lufttrocknung	12 Stunden
Montage auf den Probenhalter		
Beschichtung der Proben		

3.2.3 Befundung und Diagnosestellung

Jedem Präparat wurde nach der Untersuchung und Befundung anhand eines standardisierten Auswertungsprotokolls die Diagnose „intaktes Peritoneum“ oder „entzündlich verändertes Peritoneum“ zugewiesen.

Am Anfang der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung verschafften wir uns einen kurzen Überblick über das Präparat und dessen Qualität. Dann wurde die Probe in vier Quadranten eingeteilt, mikroskopiert und bewertet. Dabei wurden die Regionen erst in der Übersicht mit niedriger (z. B. 200facher) Vergrößerung beurteilt. Dann folgte die mäanderförmige Betrachtung mit höherer (z. B. 2000facher) Vergrößerung, um Details aufspüren zu können.

Die Befunde wurden für jeden Quadranten einzeln in einem Protokoll festgehalten. Die Einzelaspekte des Befundbogens orientierten sich an Literaturangaben über entzündliche Veränderungen des Peritoneums und berücksichtigten die Struktur der peritonealen Oberfläche, den Zustand des Mesothels und das Auftreten von Tumor- oder Entzündungszellen (1.3.1, 1.3.2). Zur Differenzierung von Tumor- und Entzündungszellen wurden Einzelaufnahmen der Tumorzellen angefertigt. Insgesamt wurde so eine einheitliche Dokumentation der Untersuchungsergebnisse ermöglicht. Zusätzlich wurden ein Ausschnitt jeder Probe in 5000-, 2000-, 1000- und 200facher Vergrößerung photographiert oder digital gespeichert. Die Bilder dokumentierten eine Übersicht des Präparates, den Zustand des Zellverbundes und Details einzelner Zellen und Zellgrenzen. Pathologische Befunde wurden in identischen Vergrößerungen festgehalten, um sie mit den regelrechten Strukturen vergleichen zu können.

Aus der Überlegung heraus, dass ein Pneumoperitoneum nur globale Veränderungen hervorrufen könnte und vereinzelte Schäden eher durch andere Ursachen wie z.B. mechanische Manipulation entstehen würden, wurde bei Auftreten entzündlicher Veränderungen (Tabelle 2) in zwei oder mehr Quadranten die Probe als „entzündlich verändert“ betrachtet. Traten diese Veränderungen in keinem oder genau einem Quadranten auf, wurde die Diagnose „intaktes Peritoneum“ gestellt.

Tabelle 2: Entzündliche Veränderungen des Peritoneums (1.3.2)

Retraktion des apikalen Zellpols der Mesothelzellen
Separation der Deckzellen mit Freilegung der Basalmembran
Ablösung des Mesothels
Feinfädige oder schwammartige Fibrinbeläge
Leukozytäre Infiltration

Anzahl und Morphologie der Mikrovilli schieden als Kriterien für die Diagnosestellung aus. Einerseits wurden in der Literatur bisher Alterationen des Mesothels auch ohne Nachweis von Veränderungen der Mikrovilli als entzündlich gedeutet (Birbeck/Wheatley 1965, Volz 1999a), andererseits finden sich keine Arbeiten, die eine Verringerung der Mikrovilli oder deren Deformation im Sinne einer Vergrößerung bzw. Verdickung oder Verkürzung als notwendige oder hinreichende Bedingungen einer entzündlichen Reaktion des Peritoneums definieren. Ferner schwankt die Anzahl der Mikrovilli auch bei intaktem Mesothel (Henderson 1987, Dobbie 1989).

3.3 Statistik

Durch das Experiment sollte anhand einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung überprüft werden, ob ein Pneumoperitoneum unter Verwendung der Insufflationsgase Helium und CO₂ eine Veränderung des Peritoneums im Sinne einer Peritonitis hervorruft (1. und 2. Hypothese) (1.3.3).

Es liegen nominal skalierte Daten (intaktes/ entzündlich verändertes Peritoneum) vor, die mit dem χ^2 – Test (exakter Test nach Fischer) getestet werden können.

Die Ergebnisse jeder Untergruppe (Helium bzw. CO₂, jeweils 2, 12, 24, 48 bzw. 96h nach Pneumoperitoneum) wurden dabei einzeln analysiert. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 10.01.

Als Grundlage für die Bestimmung der Fallzahlen dienten die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Studien nach Pneumoperitoneum anderer Arbeitsgruppen.

Dort bildeten drei oder vier Tiere jeweils eine Untergruppe. Alterationen des Peritoneums im Sinne einer Irritation oder Peritonitis, also nicht intaktes Peritoneum, wurden bei allen Tieren festgestellt (Suematsu 2001, Volz 1999b). In einem Vorversuch unserer Arbeitsgruppe wurde bei einer Kohorte (sechs Tiere) ein Pneumoperitoneum mit CO₂ und 15 mm Hg über dreißig Minuten aufgebaut. Die Biopsieentnahmen erfolgte nach 2, 12, 24, 48, 72 und 96h. Dabei zeigte sich bei allen Tieren in allen Quadranten der untersuchten Präparate ein intaktes Mesothel. Der Vorversuch ergab also der Literatur widersprechende Ergebnisse. Daraufhin wurde die Quote „entzündlich verändertes Peritoneum“/„intaktes Peritoneum“ für die Angaben aus der Literatur mit 9:1 und die des Vorversuchs mit 1:9 abgeschätzt. So ergab sich nach Festlegung der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ und der Stärke des Tests $\beta = 0,2$ eine Fallzahl von fünf Ratten pro Untergruppe.

Zur Untersuchung der Frage, ob ein CO₂-Pneumoperitoneum eine stärkere Schädigung des Peritoneums hervorruft als ein Helium-Pneumoperitoneum (3. Hypothese), wurde die Anzahl der Tiere verglichen, die ein entzündlich verändertes Peritoneum aufwiesen. Erneut wurde ein χ^2 – Test durchgeführt. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Mikroskopie des intakten Mesothels

Die abgebildeten Aufnahmen stammen vom Peritoneum eines Kontrolltieres und zeigen einen Normalbefund. Die peritoneale Oberfläche war von einer Schicht flacher Mesothelzellen bedeckt. Die Deckzellen besaßen einen unregelmäßigen, polygonalen Umriss und maßen im Durchmesser ca. 12-27 μm . Auf ihrer Oberfläche fand sich ein Teppich feiner Mikrovilli. Die Zellgrenzen waren als Rinnen angedeutet, an denen die Dichte der Mikrovilli zunahm. Eine genaue Bestimmung der Zellgrenzen gelang nur durch genaue Untersuchung mit hoher Vergrößerung.

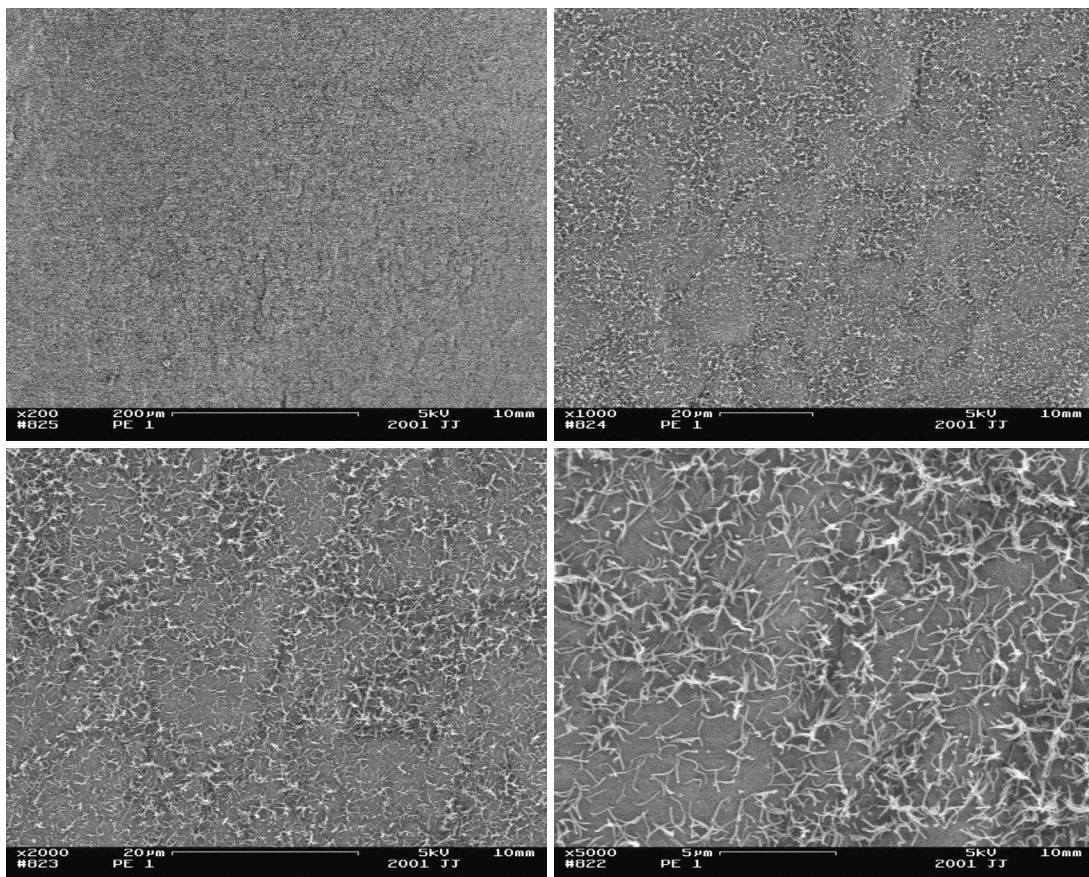


Abbildung 5: intaktes Mesothel in 200, 1000, 2000, 5000facher Vergrößerung

4.2 Aufnahmen von Tumorzellen

Die Tumorzellen präsentierten sich zum größten Teil als Rundzellen. In den Präparaten wurden aber auch ovale oder polygonale Formen gefunden. Einige der malignen Zellen schienen gerade in Mitose befindlich. Die Oberflächenstruktur der malignen Zellen war vielgestaltig. Kurze Mikrovilli, Auffältelungen, Einbuchtungen und unterschiedliche Ausstülpungen der Zellmembran waren die unterschiedlichen morphologischen Ausprägungen der Zellmembran. Der Durchmesser betrug zwischen 5 und 8,5 μm .

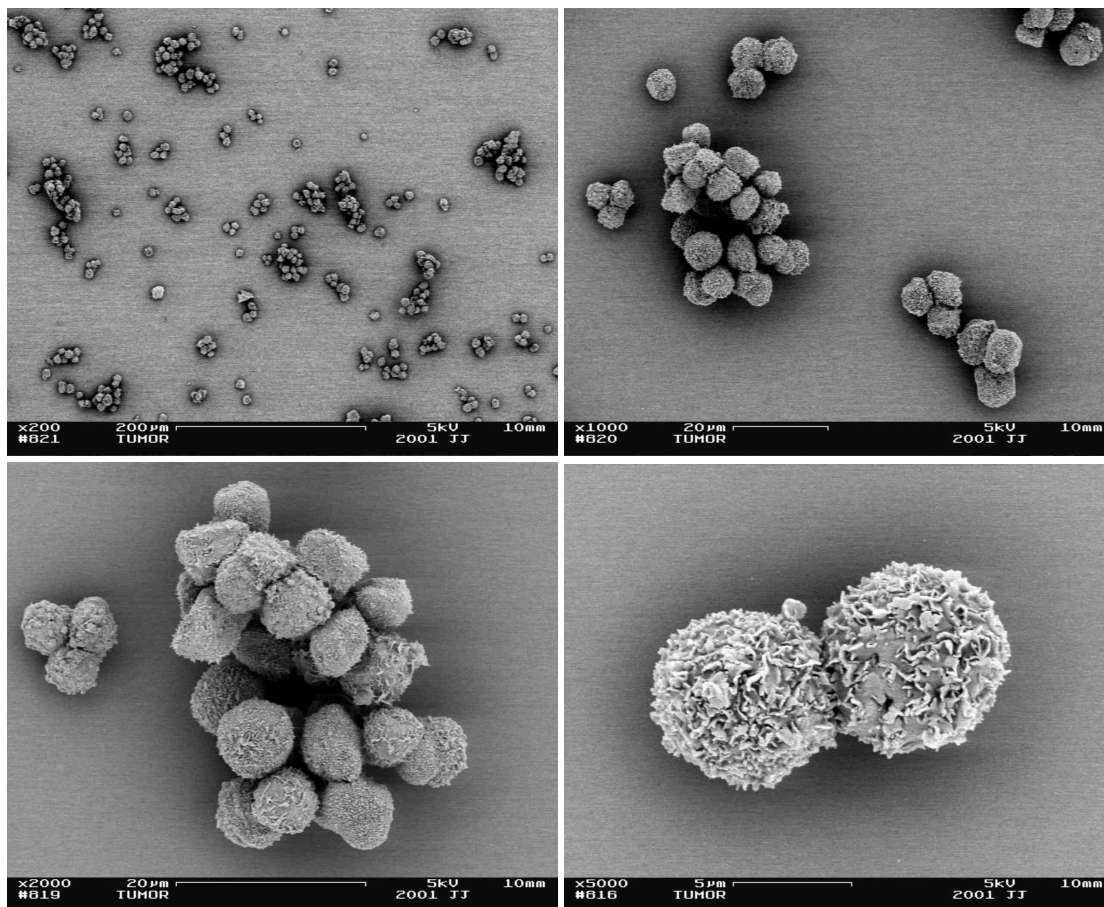


Abbildung 6: DHD/K12/12/TRb Kolonkarzinomzellen in 200, 1000, 2000 und 5000facher Vergrößerung

4.3 Dokumentation der Einzelbefunde

4.3.1 Separation der Mesothelzellen

Dieses Biopsat wurde zwölf Stunden nach CO₂-Pneumoperitoneum gewonnen. Die Mesothelzellen behielten ihre flache, polygonale Form. Zellgrenzen waren deutlich erkennbar. Dazwischen war eindeutig die Basalmembran zu erkennen. Die Verbindung zwischen den Mesothelzellen blieb durch Interzellularbrücken aufrechterhalten. Form und Anzahl der Mikrovilli waren unbeeinträchtigt.

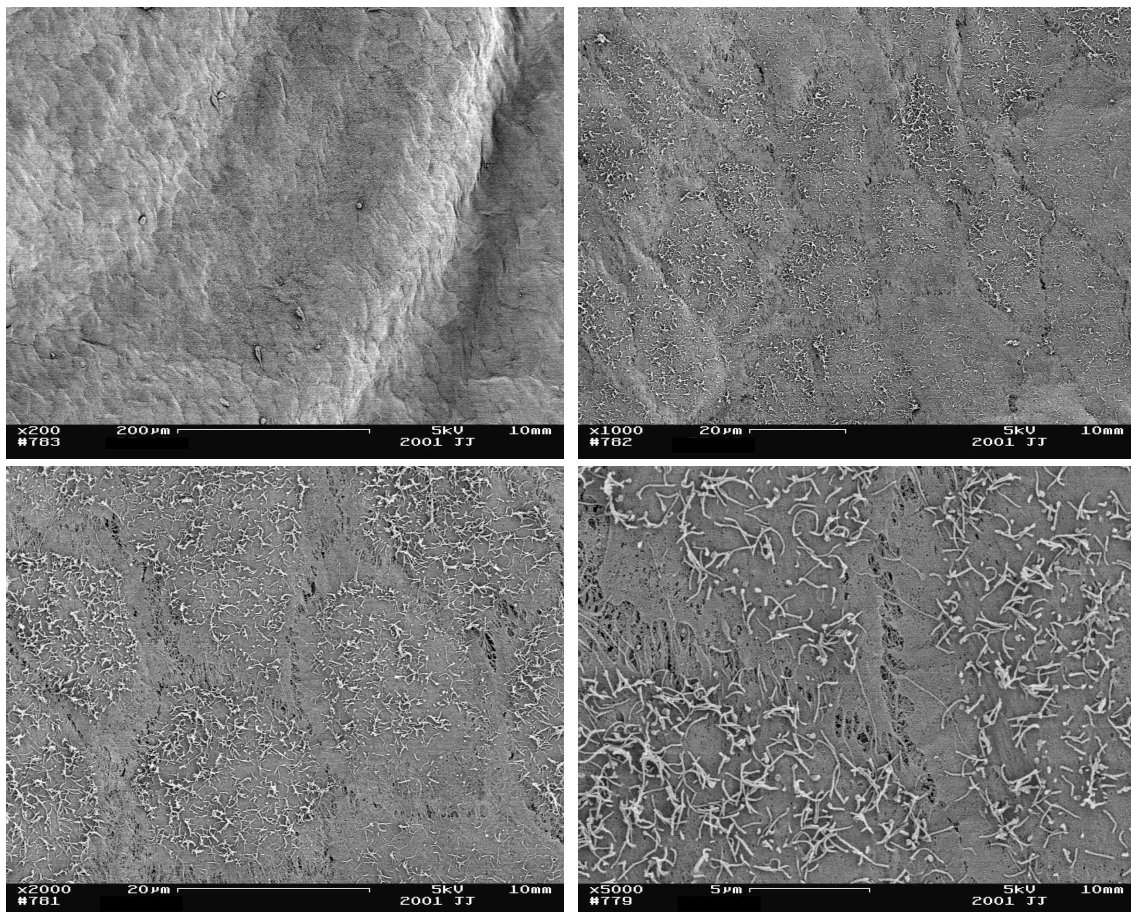


Abbildung 7: Separation der Mesothelzellen in 200, 1000, 2000 und 5000facher Vergrößerung

4.3.2 Retraktion der Mesothelzellen

Diese Bilderserie wurde von einem Präparat erstellt, das einer Ratte 96 Stunden nach Applikation eines CO₂-Pneumoperitoneums entnommen wurde. Die Mesothelzellen zeigten eine Retraktion des apikalen Zellpols der Mesothelzellen. Die Zellgrenzen waren gut erkennbar, jedoch war an keiner Stelle die Basalmembran freigelegt.

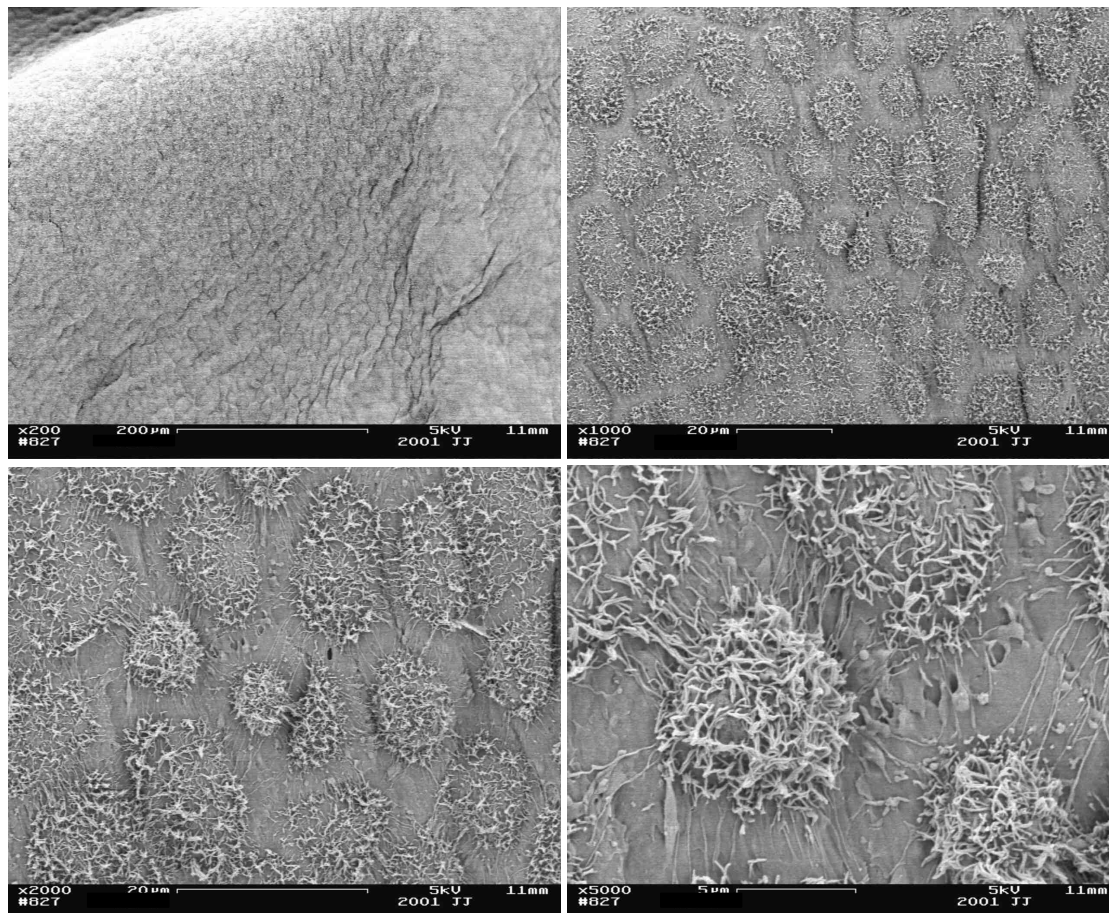


Abbildung 8: Retraktion des Mesothels in 200, 1000, 2000 und 5000facher Vergrößerung

4.3.3 Lokal begrenzte Entzündung

Wiederholt zeigten sich offensichtliche Zerstörungen des normalen Mesothelaufbaus, die durch Retraktion, Separation und Ablösung von Mesothelzellen gekennzeichnet waren, und damit das Bild einer Entzündung zeigten. Außerdem fanden sich in diesen Probenausschnitten regelmäßig Rundzellen. Diese Entzündungen waren immer streng lokal begrenzt bzw. scharf abgegrenzt. Sie dehnten sich nie auf einen ganzen Quadranten oder ein vollständiges Präparat aus. Bei Auftreten dieser Veränderung wurde der entsprechende Quadrant als „entzündlich verändert“ gewertet.

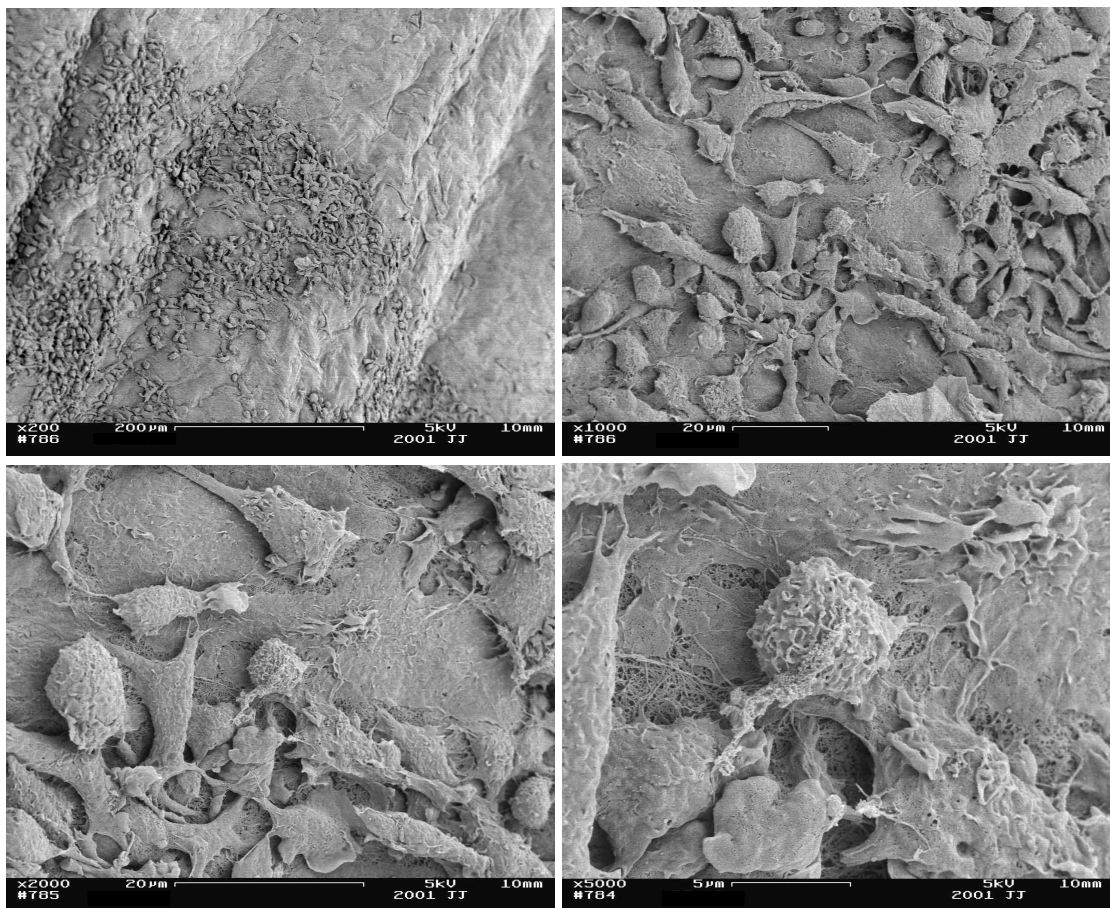


Abbildung 9: lokale Entzündung des Peritoneums in 200, 1000, 2000 und 5000facher Vergrößerung

4.3.4 Mechanisch verursachte Läsion des Peritoneums

In einer Probe eines Kontrolltieres konnte eine offensichtlich mechanische Läsion dokumentiert werden. Sie hatte die Form von zwei parallelen, ca. 5 mm langen und 6-8 μm breiten Streifen. Die Deckzellen waren abgelöst, die Basalmembran freigelegt. Es lagen keine Veränderungen des umliegenden Mesothels vor. Fibrinbeläge, Tumor- oder Entzündungszellen ließen sich nicht nachweisen.

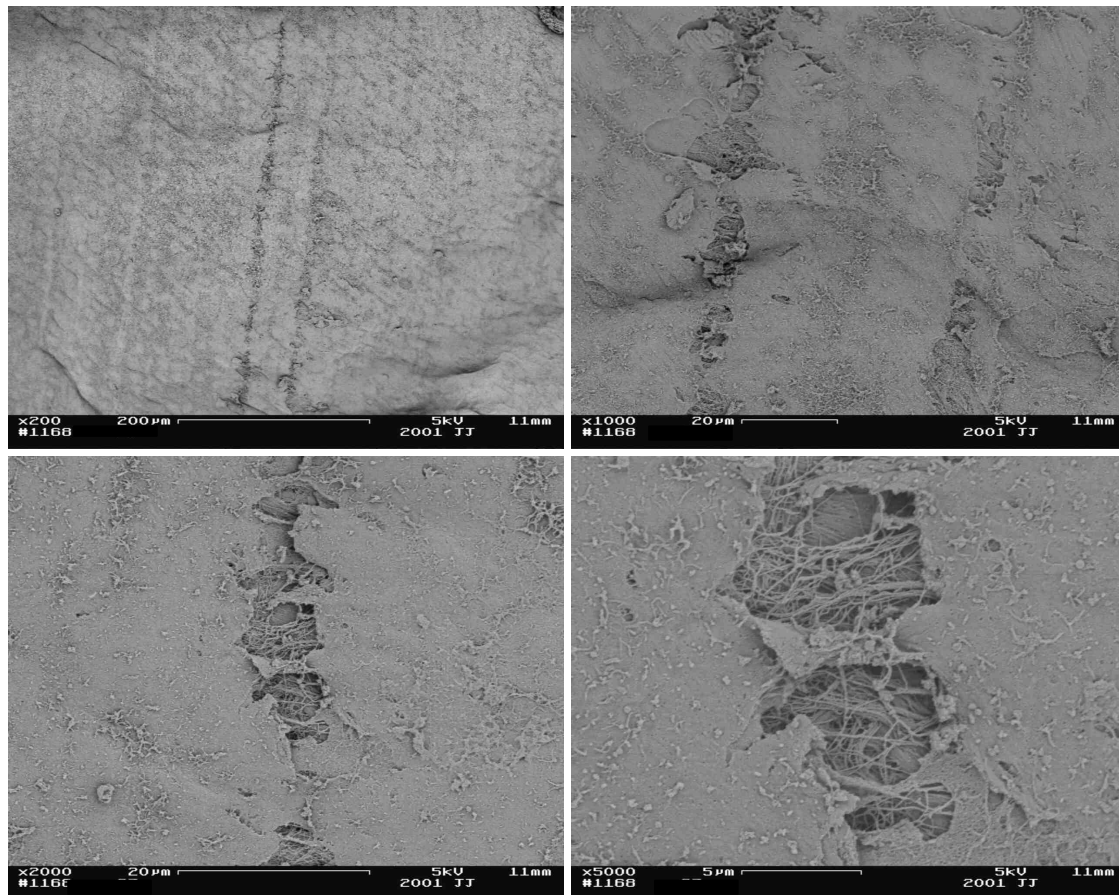


Abbildung 10: Verletzung des Mesothels in 200, 1000, 2000 und 5000facher Vergrößerung

4.3.5 Risse in der Oberfläche

In einigen Proben war das Mesothel von Rissen durchzogen. Die Risse waren bis zu 5µm breit und 150µm lang. Die Risse folgten nicht den Zellgrenzen, sondern bildeten schluchtenartige, in die Tiefe ziehende Eröffnungen der peritonealen Oberfläche.

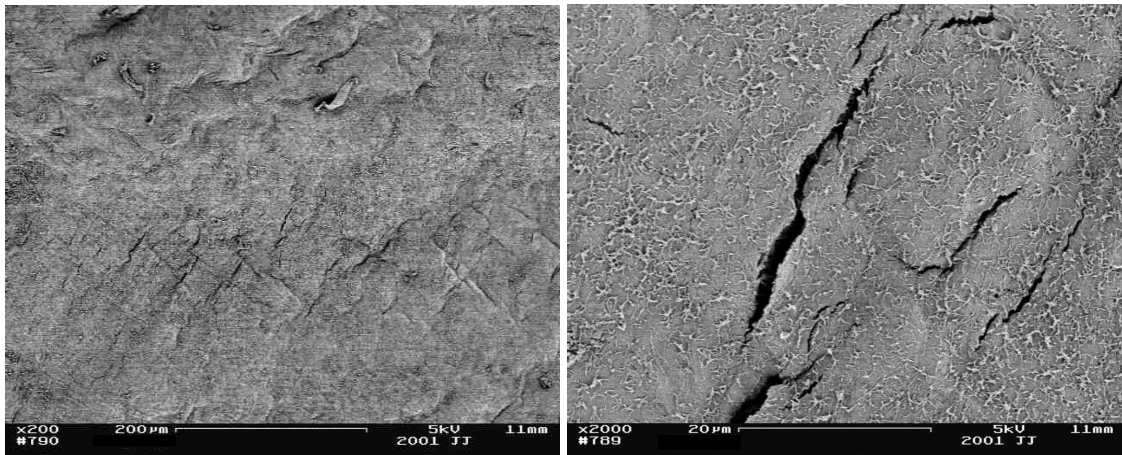


Abbildung 11: Risse in 200 und 2000facher Vergrößerung

4.3.6 Erythrozyten

Auf dem Mesothel liegende Erythrozyten waren leicht an ihrer Form und Größe zu erkennen. Sie traten einzeln oder als Zellballen auf.

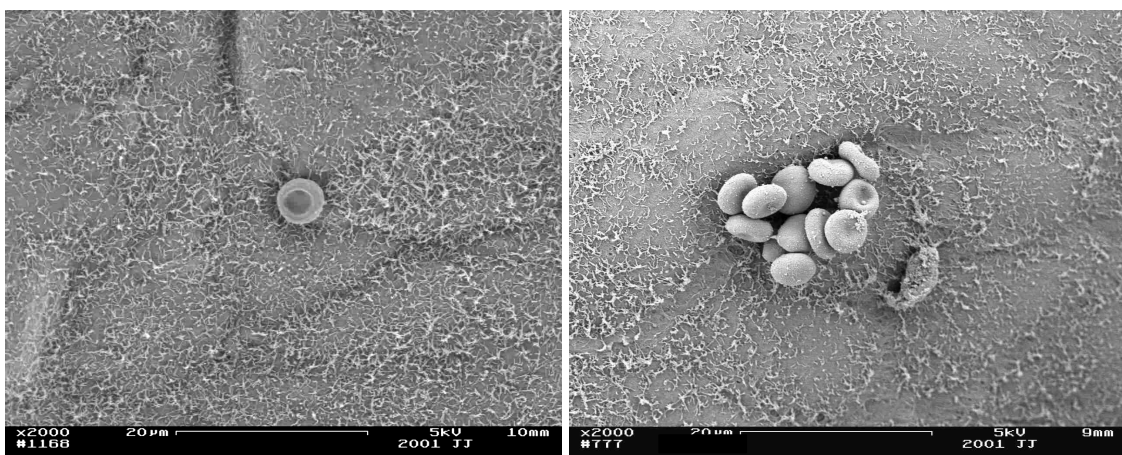


Abbildung 12: Erythrozyten in 200 und 2000facher Vergrößerung

4.3.7 Feinkörnige Beläge

Stellenweise waren die Mesothelzellen von feinkörnigen Belägen bedeckt. Diese verklebten die Mikrovilli und erschwerten die Beurteilung des Peritoneums. Sie variierten in ihrer Dichte, nicht aber in der feinkörnigen Struktur.

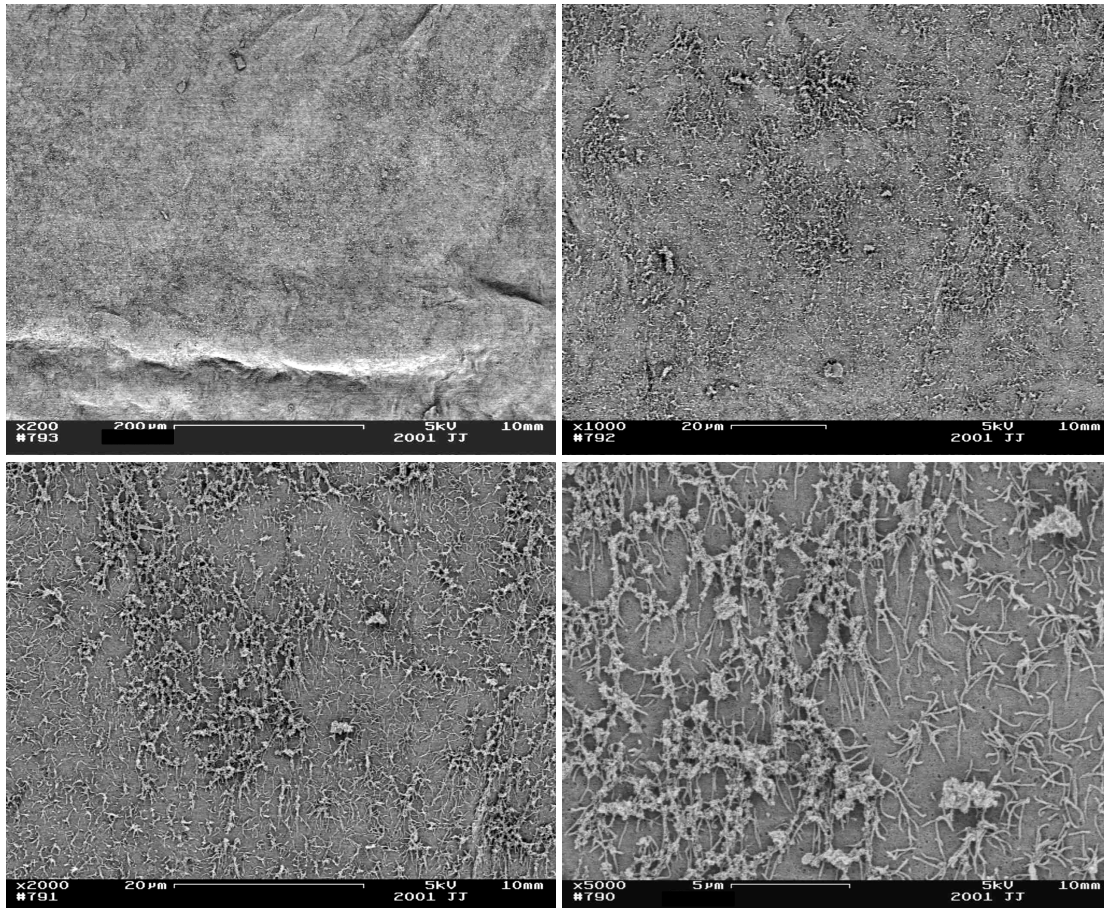


Abbildung 13: feinkörnige Beläge in 200, 1000, 2000 und 5000facher Vergrößerung

4.3.8 Rundzellen

In einigen Präparaten wurden auf dem Mesothel Rundzellen entdeckt. Sie waren nicht regelmäßig auf dem Peritoneum verteilt, sondern traten lokal gehäuft auf. Ihre Oberfläche war von feinen Auffältelungen sowie Ein- und Ausbuchtungen geprägt. Der Durchmesser lag zwischen 4 und 7.5 μm . Deutlich erkennbar war die Adhäsion der Rundzellen an die Mikrovilli des Mesothels.

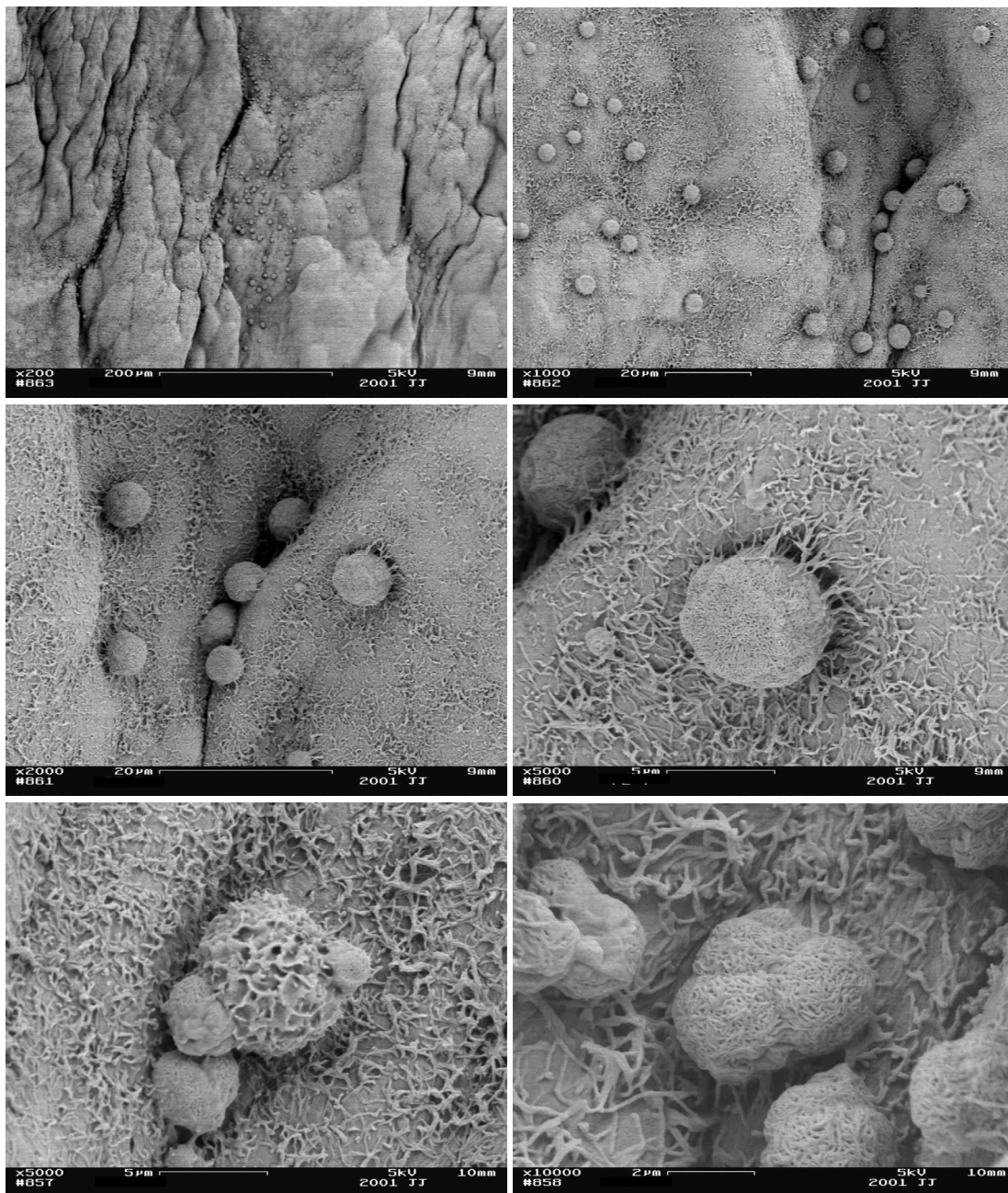


Abbildung 14: Rundzellen in 200, 1000, 2000, 5000 (2x) und 10000facher Vergrößerung

4.4 Häufigkeit der Einzelbefunde

Die folgenden Tabellen geben die Häufigkeit der Einzelbefunde an (Tabelle 3). Die Darstellung soll einen Überblick über die Verteilung der Phänomene und den Zustand bzw. die Qualität der Proben geben, daher erfolgte keine Berücksichtigung der Anzahl der betroffenen Quadranten oder der Ausprägung von Befunden.

Tabelle 3: Häufigkeit der Einzelbefunde

	Häufigkeit insgesamt			Maximale Häufigkeit je Untergruppe (n=5)		Maximale Häufigkeit je Kohorte (n=5)	
	Helium (n=25)	CO ₂ (n=25)	Kontr. (n=5)	Helium	CO ₂	Helium	CO ₂ (+1Kontr.)
Separation der Mesothelzellen	3	4	-	1	1	2	2
Retraktion der Deckzellen	4	1	-	3	1	2	1
Lokal begrenzte Entzündung	5	4	-	2	2	1	1
Mechanische Verletzung	-	-	1	-	1	0	1
Risse in der Oberfläche	3	2	-	1	1	2	1
Erythrozyten	7	5	-	4	1	4	3
Feinkörnige Beläge	6	4	1	3	1	3	2
Rundzellen	3	6	2	2	2	2	3

4.5 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Das Peritoneum aller Kontrolltiere war intakt. Als Besonderheit fand sich in einem Präparat eine offensichtlich mechanisch verursachte Läsion. In zwei Proben wurden Rundzellen entdeckt.

Tabelle 4: Auswertung der Kontrolltiere

Tier	Diagnose	Entsprechende/ Zusätzliche Befunde
1	Intaktes Mesothel	-
17	Intaktes Mesothel	Streifenförmige mechanische Läsion
27	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Beläge in zwei Quadranten Rundzellen in zwei Quadranten
34	Intaktes Mesothel	-
49	Intaktes Mesothel	Rundzellen in zwei Quadranten

4.6 Ergebnisse der Kohlendioxidgruppe

Von den 25 untersuchten Ratten konnten bei 21 Tieren keine Veränderungen des Peritoneums festgestellt werden (84 %). Viermal wurden das Peritoneum als „entzündlich verändert“ beurteilt (16 %); in keiner Untergruppe (zu keinem Zeitpunkt) war die Häufigkeit der entzündlich veränderten Proben größer als zwei (40 %).

Tabelle 5: Auswertung der Untergruppe CO₂/2, Biopsieentnahme nach **zwei Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/ Zusätzliche Befunde
2	Intaktes Mesothel	-
13	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Beläge, sowie eine große Anzahl von Erythrozyten in allen Quadranten
28	Intaktes Mesothel	-
36	Intaktes Mesothel	-
46	Intaktes Mesothel	-

Tabelle 6: Auswertung der Untergruppe CO₂/12, Biopsieentnahme nach **zwölf Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/ Zusätzliche Befunde
4	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten
16	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten in allen Quadranten
25	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten Risse in einem weiteren Quadranten
35	Entzündlich verändertes Mesothel	Separation der Mesothelzellen in allen Quadranten Feinkörnige Beläge in einem Quadranten
45	Intaktes Mesothel	Lokal begrenzte Entzündung in einem Quadranten

Tabelle 7: Auswertung der Untergruppe CO₂/24, Biopsieentnahme nach **24 Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/ Zusätzliche Befunde
5	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten Lokal begrenzte Entzündung in einem Quadranten
15	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Beläge, sowie einzelne Erythrozyten in allen Quadranten, Risse in zwei Quadranten
24	Intaktes Mesothel	-
39	Entzündlich verändertes Mesothel	Separation der Mesothelzellen in zwei Quadranten Lokal begrenzte Entzündung in einem Quadranten
48	Intaktes Mesothel	-

Tabelle 8: Auswertung der Untergruppe CO₂/48, Biopsieentnahme nach **48 Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/ Zusätzliche Befunde
6	Intaktes Mesothel	-
14	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten in zwei Quadranten
24	Intaktes Mesothel	-
37	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten
50	Intaktes Mesothel	Separation der Mesothelzellen in einem Quadranten

Tabelle 9: Auswertung der Untergruppe CO₂/96, Biopsieentnahme nach **96 Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/ Zusätzliche Befunde
3	Entzündlich verändertes Mesothel	Retraktion der Deckzellen in zwei Quadranten
12	Entzündlich verändertes Mesothel	Separation der Mesothelzellen in allen Quadranten Lokal begrenzte Entzündung in einem Quadranten
26	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten in allen Quadranten Feinkörnige Beläge in zwei Quadranten Rundzellen in einem Quadranten
38	Intaktes Mesothel	-
47	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten

4.7 Ergebnisse der Heliumgruppe

Von den 25 untersuchten Präparaten konnte in 21 Fällen ein intaktes Peritoneum diagnostiziert werden (84 %). Vier Mal wurde ein „entzündlich verändertes“ Mesothel diagnostiziert (16 %); in keiner Untergruppe war die Häufigkeit größer als zwei (40 %).

Tabelle 10: Auswertung der Untergruppe Helium/2, Biopsieentnahme nach **zwei Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/Zusätzliche Befunde
11	Entzündlich verändertes Mesothel	Retraktion des Mesothels in drei Quadranten Lokal begrenzte Entzündung in zwei Quadranten
19	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten und feinkörnige Beläge in allen Quadranten
32	Entzündlich verändertes Mesothel	Retraktion von Mesothelzellen in zwei Quadranten Lokal begrenzte Entzündung in drei Quadranten
44	Intaktes Mesothel	Retraktion von Mesothelzellen in einem Quadranten Rundzellen/ einzelne Risse in je einem Quadranten
51	Intaktes Mesothel	Rundzellen in zwei Quadranten

Tabelle 11: Auswertung der Untergruppe Helium/12, Biopsieentnahme nach **zwölf Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/Zusätzliche Befunde
8	Intaktes Mesothel	Eine große Anzahl von Erythrozyten und feinkörnigen Belägen in einem Quadranten Retraktion von Mesothelzellen in einem Quadranten
20	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten und Risse in je einem Quadranten
33	Intaktes Mesothel	-
43	Intaktes Mesothel	Rundzellen in drei Quadranten Vereinzelte Erythrozyten und feinkörnige Beläge in je einem Quadranten
53	Entzündlich verändertes Mesothel	Separation der Mesothelzellen in zwei Quadranten Feinkörnige Beläge, eine große Anzahl von Erythrozyten in allen Quadranten Lokal begrenzte Entzündung in einem Quadranten

Tabelle 12: Auswertung der Untergruppe Helium/24, Biopsieentnahme nach **24 Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/Zusätzliche Befunde
7	Intaktes Mesothel	-
18	Intaktes Mesothel	Risse in drei Quadranten Lokal begrenzte Entzündung in einem Quadranten
31	Intaktes Mesothel	-
41	Entzündlich verändertes Mesothel	Feinkörnige Beläge und eine große Anzahl von Erythrozyten in allen Quadranten Separation der Mesothelzellen in allen Quadranten
54	Intaktes Mesothel	-

Tabelle 13: Auswertung der Untergruppe Helium/48, Biopsieentnahme nach **48 Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/Zusätzliche Befunde
9	Intaktes Mesothel	-
22	Intaktes Mesothel	-
30	Intaktes Mesothel	-
42	Intaktes Mesothel	Separation der Mesothelzellen in einem Quadranten Einzelne Erythrozyten in je drei Quadranten, Feinkörnige Beläge in zwei Quadranten
55	Intaktes Mesothel	-

Tabelle 14: Auswertung der Untergruppe Helium/96, Biopsieentnahme nach **96 Stunden**

Tier	Diagnose	Entsprechende/Zusätzliche Befunde
10	Intaktes Mesothel	-
21	Intaktes Mesothel	-
29	Intaktes Mesothel	Risse in drei Quadranten Feinkörnige Beläge, Erythrozyten in zwei Quadranten
40	Intaktes Mesothel	Eine große Anzahl von Erythrozyten in allen Quadranten
52	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Beläge und einzelne Erythrozyten in allen Quadranten

4.8 Statistische Auswertung

Bei jeweils 25 Tieren wurde mit CO₂ oder Helium ein Pneumoperitoneum über 15 mm Hg und 30 min aufgebaut. In beiden Gruppen wurde danach nur bei 4 Tieren ein entzündlich verändertes Mesothel beobachtet. Die Hypothesen, dass ein Pneumoperitoneum mit den Insufflationsgasen CO₂ bzw. Helium eine morphologisch fassbare entzündliche Veränderung des Peritoneums der Ratte verursacht (1.3.3), wurden somit abgelehnt. Das Ergebnis war für beide Gruppen signifikant ($P < 0,05$). (3.3, Tabelle 15).

Ein Unterschied zwischen der Helium- und der CO₂- Gruppe wurde nicht festgestellt.

Tabelle 15: Statistische Auswertung der Untergruppen

Untergruppe	Anzahl der Tiere	Intaktes Mesothel	Entzündlich verändertes Mesothel	P – Wert
Helium/2	5	3	2	< 0,01
Helium/12	5	4	1	< 0,01
Helium/24	5	4	1	< 0,01
Helium/48	5	5	0	< 0,01
Helium/96	5	5	0	< 0,01
CO ₂ /2	5	5	0	< 0,01
CO ₂ /12	5	4	1	< 0,01
CO ₂ /24	5	4	1	< 0,01
CO ₂ /48	5	5	0	< 0,01
CO ₂ /96	5	3	2	< 0,01
Kontrolle	5	5	0	-/-

5 Diskussion

5.1 Interpretation der Einzelbefunde

5.1.1 Artefakte

Erythrozyten, feinkörnige Beläge, Risse und mechanische Läsionen wurden als Präparationsartefakt angesehen.

Um die Peritoneumsbiopsien zu entnehmen, wurde die Bauchhöhle eröffnet. Dabei kam es mitunter zur Kontamination des Peritoneums mit Blut. Obwohl die Proben abgespült wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei Erythrozyten am Mesothel haften blieben (4.3.6). Die Verunreinigung von Proben des Bauchfells durch rote Blutkörperchen wurde zuvor von Dobbie bei Untersuchungen des Peritoneums im Zusammenhang mit der Peritonealdialyse beschrieben und explizit als Artefakt bezeichnet (Dobbie 1989).

Feinkörnige Beläge repräsentieren am ehesten einen Niederschlag von Proteinen (4.3.7). Sie könnten durch Blutungen während der Biopsieentnahme oder infolge eines serösen Exsudates entstanden sein. Im ersten Fall wären sie definitiv als Artefakt zu werten. Im zweiten könnte ein seröses Exsudat Ausdruck einer entzündlichen Veränderung sein. Eine Assoziation der feinkörnigen Beläge mit anderen entzündlichen Veränderungen ließ sich aber nicht feststellen. Außerdem unterschieden sich die Beläge in ihrer Struktur eindeutig von in der Literatur beschriebenen, im Zusammenhang mit Entzündungen auftretenden, schwammartigen oder feinfädigen Fibrinauflagerungen (Jonecko 1990, Henrich 1986). Daher ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um Präparationsartefakte handelt.

In einigen Proben war das Mesothel von Rissen durchzogen (4.3.5). Anders als die Spalten zwischen separierten Deckzellen folgten die Risse nicht den Zellgrenzen. Die unter dem Mesothel liegende Basalmembran war nicht freigelegt, sondern vielmehr durchtrennt. Das Auftreten von Rissen war immer lokal begrenzt. Die für die Rasterelektronenmikroskopie notwendige Entwässerung und Trocknung der Proben verursachen regelmäßig eine Schrumpfung des organischen Materials, die zu dessen

Zerreißung führen kann (Braet 1997). Daher entstanden Risse am ehesten während der Präparation und sind als Schrumpfungsartefakte anzusehen.

Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, dass es sich bei der Separation der Mesothelzellen (4.3.1) ebenfalls um ein Schrumpfungsartefakt handelt, wie es in ähnlicher Form bei Endothelzellen der Kornea von Virtanen beschrieben wurde (Virtanen 1984). Die interzellulären Verbindungen zwischen den Deckzellen bestehen u.a. aus Desmosomen und sind beständig gegenüber mechanischer Belastung (Dobbie 1989). Denkbar wäre, dass die Zellen schrumpften und die Tendenz entwickelten, sich voneinander zu trennen. An Orten bestehender Zellkontakte blieben sie dann miteinander verbunden, während sich dazwischen Lücken bildeten und die Basalmembran interzellulär sichtbar wurde. Andererseits wurde eine Separation von Mesothelzellen in der Literatur bislang regelmäßig als Zeichen einer entzündlichen Reaktion des Bauchfells betrachtet (1.3.2). Daher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der Separation der Deckzellen nicht um Artefakte handelte, sondern um eine entzündliche Veränderung.

In einer Probe aus der Kontrollgruppe wurden zwei streifenförmige Verletzungen des Peritoneums dokumentiert (4.3.4). Die parallele Anordnung und der schnurgerade Verlauf lassen keinen anderen Schluss zu, als dass diese Läsion durch artifizielle mechanische Manipulation verursacht wurde.

5.1.2 Entzündliche Veränderungen des Mesothels

Das alleinige Auftreten von Separation oder Retraktion der Mesothelzellen wurden jeweils als entzündliche Veränderungen gewertet (1.3.2). Die Veränderungen waren nicht punktuell zu finden, sondern ihr Auftreten hatte eher flächigen Charakter. Ihrer Morphologie und ihrem Ausbreitungsmuster nach lassen sich die Veränderungen mit dem Einwirken einer global wirkenden Noxe vereinbaren, wie sie Insufflationsgas und –druck darstellen. Diese Phänomene traten jedoch nur fünf bzw. sieben Mal insgesamt auf, im Verhältnis zur Gesamtzahl der Proben (55) also eher selten (Tabelle 3).

Aufgrund des gleichzeitigen Auftretens der Einzelbefunde Retraktion, Separation und Ablösung der Deckzellen sowie Deformation der Mikrovilli und des Vergleichs dieser Phänomene mit Aufnahmen aus der Literatur ist davon auszugehen, dass die „lokal begrenzten Entzündungen“ keine Artefakte darstellen (4.3.3, Guo 1993, Lethola 1986, Whitaker/Papadimitriou 1985). Da die verursachende Noxe keinen Einfluss auf die

Morphologie der entzündlichen Veränderungen des Peritoneums hat, kann aus dem alleinigen Auftreten derselben kein Rückschluss auf die Ursache gezogen werden (1.3.2). Der äußere Umriss der lokalen Entzündungen war unregelmäßig und lässt somit – anders als bei der mechanischen Läsion (4.3.4, 5.1.1) – ebenfalls keinen Schluss auf deren Genese zu. Das Auftreten von Rundzellen innerhalb dieser lokalen inflammatorischen Veränderungen gibt insofern keine Erklärung, da – selbst wenn es sich dabei um die Absiedlung Tumorzellen handelte (5.1.3) – nicht zwischen Ursache und Folge unterschieden werden könnte: Tumorzellen können sowohl entzündliche Veränderungen des Mesothels induzieren als auch mit hoher Affinität an solchen anhaften (Buck 1973, Aoki 1999). Das eindeutig regional begrenzte Vorkommen spricht gegen die Vermutung, Insufflationsgas oder –druck hätten diese Form der entzündlichen Veränderung hervorgerufen, da diese am ehesten großflächige Veränderungen hervorrufen würden. Denkbar wäre, dass es bei einigen Tieren während des Pneumoperitoneums zu einer lokalen Kontamination der Bauchhöhle mit Staub oder Bakterien oder Latexpartikel und einer entsprechenden Entzündungsreaktion kam.

5.1.3 Rund – und Tumorzellen

Rundzellen wurden felderförmig verteilt auf intaktem Mesothel oder innerhalb von lokal begrenzten entzündlichen Veränderungen des Mesothels beobachtet (4.3.3, 4.3.8). Unklar ist, um welche Art von Zellen es sich handelt.

Betrachtet man die Morphologie der Rundzellen, könnte es sich dabei um Entzündungszellen wie Makrophagen bzw. Lymphozyten einerseits oder um Tumorzellen andererseits handeln. Papadimitriou beschrieb Peritonealmakrophagen anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen als runde bis ovale Zellen, deren Oberfläche Mikrovilli, Fältelungen, Rillen, Furchen, Ausstülpungen und Einsenkungen zeigte (Papadimitriou 1973). Ihr Durchmesser gab er mit 5-20 μm an. Kaufman erkannte in elektronenmikroskopischen Studien des Peritoneums Lymphozyten; es waren Rundzellen, die einen Durchmesser von 5 μm hatten und auf ihrer Oberfläche Mikrovilli besaßen (Kaufman 1982). In der gleichen Arbeit gab er die Größe von Makrophagen mit 10-12 μm an; Granulozyten maßen 7 μm und ihre Oberfläche war von Auffältelungen gekennzeichnet. Koga untersuchte die Implantation von Leberkarzinomzellen in der Bauchhöhle. Sie konnten als Rundzellen mit einem

mittleren Durchmesser von 16 μm eindeutig von mesothelialen Deckzellen unterschieden werden (Koga 1980). In den Aufnahmen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kolonkarzinomzellen charakterisierten kurze Mikrovilli sowie feine Auffältelungen und Einbuchtungen die Zelloberfläche (3.1.1, 4.2). Der Zelldurchmesser betrug zwischen 5 und 8,5 μm . Die Oberfläche der in den Proben vorhandenen Rundzellen war von feinen Auffältelungen sowie Ein- und Ausbuchtungen geprägt. Ihr Durchmesser lag zwischen 4 und 7,5 μm (4.3.8). Ihrer Morphologie nach könnte es sich also sowohl um die applizierten Tumorzellen als auch um Peritonealmakrophagen handeln.

Beurteilt man zusätzlich die Anordnung der Rundzellen auf dem Peritoneum, muss die Lokalisation ihres Auftretens hinzugezogen werden. Zum einen fanden sich Rundzellen in Bereichen inflammatorischer Veränderungen (4.3.3), zum anderen regional begrenzt auf dem Mesothel aufliegend (4.3.8), diese Form wird im weiteren als Rundzellfeld bezeichnet.

Im Falle der Rundzellfelder spricht das Vorliegen von Mitosen der Rundzellen gegen die Annahme, dass es sich hierbei um Entzündungszellen handelt, da diese sich nicht mehr in der Peripherie teilen (Junqueira/Carneiro 1996). Außerdem spräche das gehäufte Vorkommen von Makrophagen oder anderen Entzündungszellen für das Vorliegen einer entzündlichen Reaktion; das Auftreten von Rundzellen war aber nicht regelmäßig mit weiteren entzündlichen Veränderungen assoziiert. Die Beobachtungen von Mitosen und die Anordnung in Gruppen lassen sich dagegen gut mit der Annahme vereinbaren, es handele sich bei den Rundzellen um Tumorzellen.

Innerhalb lokal begrenzter Entzündungen fanden sich keine Mitosen der Rundzellen. Das Vorliegen entzündlicher Veränderungen ohne die vorherige Zugabe von Tumorzellen würde für die Diagnose „Makrophagen“ sprechen, die sich in einer Arbeit von Haney et al. regelmäßig nach Verletzungen des Peritoneums an entsprechender Stelle nachweisen ließen (Haney 2000). In diesem Zusammenhang ist aber zu bedenken, dass sich intraperitoneale Metastasen bevorzugt an Orten von Bauchfellläsionen bilden (Aoki 1999), Tumorzellen demgemäß eine hohe Affinität zu geschädigten Bezirken des Mesothels besitzen. Die Lokalisation der Rundzellen an Orten entzündlicher

Veränderungen eröffnet daher keine Möglichkeit, zwischen Makrophagen und Tumorzellen zu unterscheiden.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass sich die Rundzellen aufgrund ihrer Morphologie und Anordnung nicht identifizieren ließen. Es ist sogar in Frage zu stellen, ob es sich hierbei um einen einheitlichen Zelltyp handelt, z.B. könnten innerhalb der Rundzellularfelder Tumorzellen und im Zusammenhang mit entzündlichen Veränderungen des Mesothels Makrophagen aufgetreten sein.

5.2 Interpretation der Ergebnisse

5.2.1 Intakte Morphologie des Rattenperitoneums nach Pneumoperitoneum?

Das Peritoneum aller Kontrolltiere präsentierte ein intaktes Mesothel. Die Oberfläche der parietalen Bauchwand war von einer Schicht flacher Mesothelzellen typischer Morphologie und Anordnung bedeckt. Die Biopsate der Kontrolltiere wurden zwei Stunden nach Applikation der Narkose und Injektion der malignen Zellen entnommen; in diesem Zeitraum hätten bei Einwirkung einer Noxe Veränderungen des Peritoneums erkennbar sein müssen (1.3.2). Es war daher davon auszugehen, dass die intraperitoneale Injektion von Tumorzellen und die Durchführung der Anästhesie keine morphologischen Alterationen des Mesothels verursachten.

Von den je 25 Ratten, denen ein Pneumoperitoneum mit dem Insufflationsgas CO₂ oder Helium bei einem Insufflationsdruck von 15 mm Hg appliziert wurde, konnten jeweils bei 21 Tieren (84 %) keine Veränderungen des Peritoneums im Sinne einer Entzündung festgestellt werden. Viermal wurden in jeder Gruppe entzündliche Veränderungen beobachtet und ein nicht intaktes Peritoneum diagnostiziert (16 %). Es lag keine Häufung der als global entzündlich veränderten Proben innerhalb einer Kohorte oder Untergruppe vor, d.h., diese Fälle waren weder innerhalb der Tiere konzentriert, die zugleich einem Pneumoperitoneum unterzogen wurden, noch traten sie gehäuft auf bei Tieren, denen die Proben zu einem gleichen Zeitpunkt nach dem Pneumoperitoneum entnommen wurden. Entzündliche Veränderungen traten also sowohl selten als auch zufällig verteilt auf.

Daher wurden die Hypothesen, „ein Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid oder Helium verursachte entzündliche Veränderungen des Peritoneums“, abgelehnt ($P < 0,01$). Ein Unterschied zwischen den Gruppen wurde nicht festgestellt ($P < 0,01$).

Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen experimenteller Studien anderer Autoren.

Volz et al. untersuchten rasterelektronenmikroskopisch das parietale Peritoneum von Mäusen nach Kapnoperitoneum und dokumentierten entzündliche Veränderungen, die bei Zugabe von Tumorzellen in die Bauchhöhle eine Peritonealkarzinomatose begünstigten (Volz 1999a, Volz 1999b). Die Veränderungen zeigten sich ausnahmslos bei allen Tieren. Die Kriterien zur Beurteilung der peritonealen Alterationen sowie die Zeitpunkte der Probenentnahmen (0 – 96h), das verwendete Gas und die Dauer des Eingriffs entsprachen der vorliegenden Studie. Im Unterschied dazu verwendeten Volz et al. jedoch Mäuse (vs. Ratten) als Versuchstiere und einen dementsprechend geringeren Insufflationsdruck (4 vs. 15 mm Hg). Während sich bei den Mäusen exemplarisch der Verlauf einer Peritonitis beobachten ließ, wurden im vorliegenden Versuch keine Veränderungen des Rattenperitoneums dokumentiert. Anzumerken ist, dass Volz et al. Melanomzellen injizierten, die nicht zu den typischen malignen Zellen zu zählen sind, die man in der Bauchhöhle erwartet. Anhand dieser Tatsache kann das maligne Wachstumsmuster in Frage gestellt werden, die entzündlichen Veränderungen des Bauchfells wurden von der Arbeitsgruppe jedoch auch ohne Applikation von Tumorzellen beobachtet, so dass sie eindeutig auf das applizierte Kapnoperitoneum zurückgeführt wurden (Volz 1999a).

Rasterelektronenmikroskopische Betrachtungen des Mesothels von Mäusen innerhalb von drei Tagen nach Laparotomien und Laparoskopien mit unterschiedlichen Gasen (CO_2 , Helium, Luft) wiesen nach Angaben von Suematsu et al. Alterationen der peritonealen Oberfläche unterschiedlicher Ausprägung nach, die sich bei längerer Operationsdauer (30 – 90 min) und steigendem Insufflationsdruck (5 und 10 mm Hg) in zunehmendem Maße dokumentieren ließen (Suematsu 2001). Diese Ergebnisse sind allerdings hinsichtlich verschiedener Aspekte kritisch zu betrachten. Die unterschiedlichen Veränderungen des Peritoneums in der Laparotomiegruppe (Ablösungen von Deckzellen) und der Laparoskopiegruppe (Retraktion und Separation

der Deckzellen) führten die Autoren auf unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen zurück. Die Verschlechterung der Befunde wurde anhand der „stärkeren Ausprägung der Interzellularspalten“ dokumentiert, dieses Kriterium wurde jedoch nicht quantifiziert und auf eine evtl. Freilegung der Basalmembran wurde nicht eingegangen. Außerdem untersuchten Suematsu et al. viszerale Peritoneum, das physiologischerweise durch kubische Zellen und tiefe Interzellularfurchen gekennzeichnet ist (Michailova 1999, Jonecko 1990). In diesen Punkten sind die Aussagen Suematsus nicht in sich schlüssig bzw. nicht mit der Literatur in Einklang zu bringen (1.3.2), was sich u.a. darin widerspiegelt, dass die Autoren außer Volz et al. keinen weiteren Wissenschaftler zitieren, der die Morphologie des Peritoneums und deren Alterationen untersuchte (Suematsu 2001).

Schaeff et al. beschrieben pathologische Veränderungen des humanen Mesothels während der ersten drei Stunden laparoskopischer Eingriffe, die während gaslosen minimal invasiven und konventionellen Operationen „nicht regelhaft und in dieser Ausprägung“ beobachtet wurden (Schaeff 1998a). Es wurden insgesamt 36 Biopsate entnommen, die Anzahl der Patienten pro Gruppe und die Anzahl der Proben pro Patient wurden nicht genannt. Weiterhin machten die Autoren keine Angaben über die Art der Erkrankungen, deren intraperitoneales Ausmaß und die durchgeführten Operationen. Ob die entzündlichen Veränderungen Folge der Grundkrankheit oder des Operationsverfahrens waren, wurde in der Arbeit nicht erörtert. Ebenfalls beschrieben die Autoren nicht, inwieweit sie die Entnahme und Auswertung der Proben standardisierten. Eindeutige Aussagen über die Auswirkungen des Pneumoperitoneums auf das Bauchfell konnten daher nicht aus den Ergebnissen der Arbeit abgeleitet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit denen von Bloechle et al. überein (Bloechle 1999). Wurde bei Ratten eine Peritonitis durch Magenperforation induziert und im Folgenden eine Laparoskopie durchgeführt, konnten im Anschluss an das Pneumoperitoneum rasterelektronenmikroskopisch eindeutig die Zeichen einer Peritonitis beobachtet werden. In der Kontrollgruppe jedoch, die lediglich einem Pneumoperitoneum unterzogen wurde, zeigte sich während des Eingriffs und bis zu 12h später (letzter untersuchter Zeitpunkt) ein intaktes Mesothel. Die beschriebenen Lageveränderungen der Mikrovilli (flach liegend oder aufgerichtet) und die

Faltenbildung des Bauchfells entsprechen am ehesten Artefakten, wurden in der Literatur nicht als wesentliches Kriterium zur Diagnose einer Peritonitis herangezogen und sind daher nicht als relevante Veränderung anzusehen (1.3.2). Während eine Magenperforation also eindeutig eine Peritonitis hervorrief, konnten nach Applikation des Pneumoperitoneums keine entzündlichen Veränderungen nachgewiesen werden.

Zur Aufklärung der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse könnten systematische Unterschiede bzw. Fehler in den Arbeitstechniken der unterschiedlichen Arbeitsgruppen herangezogen werden. Die Ergebnisse könnten in Abhängigkeit von Insufflationsgas, –druck, und –fluss, von Zusammensetzung der Tumorzellsuspensionen und Fixierungslösungen sowie von der Wahl der Versuchstiere variieren.

Die unterschiedlichen Ergebnisse ließen sich nicht durch die Verwendung der unterschiedlichen Insufflationsgase erklären, denn sowohl pathologische Veränderungen des Bauchfells als auch dessen Unversehrtheit wurden unter Verwendung von Helium und CO₂ beschrieben (Bloechle 1999, Suematsu 2001, Volz 1999a). Die Höhe des Insufflationsdruckes war am ehesten abhängig vom Tiermodell. In den Experimenten wurden Drücke von 4 bis 15 mm Hg aufgebaut. Eine Abhängigkeit der Alterationen des Mesothels von der Stärke des Druck – soweit hier vergleichbar – spiegelte sich in den Ergebnissen nicht wider. Ebenso kamen die Fixierungslösungen nicht als Störfaktoren in Frage. Das Peritoneum der ebenfalls damit behandelten Kontrolltiere war in jeder der hier diskutierten Arbeiten unversehrt. Volz et al. injizierten Tumorzellsuspensionen in die Bauchhöhle, deren Bestandteile für sich allein Veränderungen des Bauchfells hätten verursachen können (Volz 1999a). Die Zeichen einer Peritonitis konnten in demselben Tiermodell aber auch ohne Tumorzellinjektion nachgewiesen werden (Volz 1999b). Außerdem hatte die einfache Injektion der malignen Zellen in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Morphologie des Peritoneums. Weiterhin ergab sich die Frage nach dem Einfluss der Tierspezies, die untersucht wurde. Während in den Untersuchungen von Maus und Mensch Veränderungen des Mesothels im Sinne einer Peritonitis vorlagen, beschrieben Bloechle et al. übereinstimmend mit der vorliegenden Studie eine intakte Morphologie des Bauchfells von Ratten nach Applikation eines Pneumoperitoneums (Bloechle 1999, Schaeff 1998a, Suematsu 2001, Volz 1999a). Im Gegensatz dazu fanden Hazebroek et al. entzündliche Veränderungen des Peritoneums auch bei Ratten, so dass eine stärkere

Resistenz des Rattenperitoneums nicht für das Phänomen verantwortlich gemacht werden konnte (Hazebroek 2002).

Weiterhin mussten der Gasfluss und –verbrauch während des Pneumoperitoneums berücksichtigt werden. In Betracht gezogen wurden diese Faktoren in der Literatur bisher nur zur Erklärung der Tumorzellausbreitung innerhalb der Bauchhöhle als sogenannter Chimney-Effect (Whelan 1996). Vorstellbar wäre jedoch, dass ein starker Fluss trockenen Gases eine Austrocknung des Peritoneums verursachen und das Bauchfell global schädigen könnte. Außerdem könnte im Sinne einer Scherkraft ein gerichteter Gasfluss das Peritoneum beeinträchtigen. Hazebroek et al. untersuchten den Einfluss von Temperatur und Insufflationsgasfeuchtigkeit auf die peritoneale Morphologie (Hazebroek 2002). Retraktion und Separation der Mesothelzellen ergaben sich unabhängig davon, ob für die Aufrechterhaltung des Pneumoperitoneums feuchtwarmes oder kalttrockenes Kohlendioxid verwendet wurde. Es lassen sich aus den Ergebnissen keine Rückschlüsse auf die Auswirkungen des Gasflusses ziehen, die Austrocknung des Mesothels durch einen starken Gasfluss hingegen scheint jedoch kein wesentlicher Faktor der morphologischen Veränderungen zu sein. Weiterhin könnte ein hoher CO₂– Gasfluss die mit dem Kapnoperitoneum verbundenen Phänomene Hypoxie, Hyperkapnie und Azidose verstärken und somit zu einer Schädigung des Bauchfells führen. Auch wenn sich im vorliegenden Experiment keine solchen Veränderungen zeigten, ist nicht auszuschließen, dass ein stärkerer Gasfluss, wie er z.B. während Operationen durch den Wechsel von Instrumenten entsteht, sich negativ auswirken könnte. Übereinstimmend damit berichteten Hazebroek et al., dass in einem Vorversuch versehentlich ein sehr hoch eingestellter Gasfluss (bis zu 50 l/min) zu erheblichen Alterationen des Mesothels führte, die bei normalen bzw. niedrigeren Gasflüssen nicht zu dokumentieren waren (persönliche Mitteilung). Im vorliegenden Experiment wurden ein maximaler Gasfluss von 1 l/min erreicht und 0,3 l Gas/ 30 min/ Tier verbraucht. Entzündliche Veränderungen des Bauchfells wurden dadurch nicht verursacht. Die Autoren der hier berücksichtigten Studien (Bloechle 1999, Volz 1999a, Suematsu 2001, Schaeff 1998b) gingen nicht weiter auf den Gasfluss bzw. –verbrauch ein, bzw. dokumentierten sie nicht. Vorstellbar wäre, dass in einigen Fällen ein zu hoher Gasfluss entzündliche Veränderungen verursachte.

Zusammenfassend war festzustellen, dass im vorliegenden Experiment ein Pneumoperitoneum mit den Insufflationsgasen CO₂ oder Helium keine entzündlichen Veränderungen des Peritoneums verursachte. Dieses Ergebnis stehen im Gegensatz zu anderen Studien über die Morphologie des Bauchfells nach Pneumoperitoneum. Dieser Widerspruch könnte z.B. durch die verwendeten Tiermodelle, die applizierte Tumorzelllinie oder unterschiedlichen Gasfluss erklärt werden.

5.2.2 Inzisionsmetastasen und intraperitoneales Tumorwachstum

Das Auftreten von Trokarmetastasen infolge von laparoskopischen Eingriffen führte zu intensiver Forschung über deren Ursachen. In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob die Operationstechnik in kausalem Zusammenhang mit dem Auftreten von Metastasen steht. Im Allgemeinen wurden bisher für die Entstehung von Inzisionsmetastasen unabhängig vom operativen Verfahren hauptsächlich instrumentelle Manipulation am tumortragenden Organ, v.a. die intraoperative Tumorverletzung, und die damit verbundene Kontamination der Bauchhöhle durch Tumorzellen verantwortlich gemacht (siehe hierzu auch Kapitel 1.2.2).

Eine entscheidende Rolle spielten dabei die Freisetzung von Zytokinen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Freilegung von Proteinen der extrazellulären Matrix im Wundbereich von Inzisionen und intraperitonealen Traumata (Aoki 1999, Goldstein 1993, Skipper 1989).

In einer Reihe von tierexperimentellen Studien waren die Wahl des Operationsverfahrens sowie im Falle der Laparoskopie die Insufflationsgase und – drücke bestimmende Faktoren für das Ausmaß des intraperitonealen Tumorwachstums und der Anzahl der Trokarmetastasen (Allendorf 1995, Bouvy 1996, Mathew 1996, Jacobi 1998b). Dabei war das Tumorwachstum nach gaslosen Laparoskopien geringer als nach konventionellen Laparoskopien oder Laparotomien.

Es gibt überdies Hinweise darauf, dass eine Kohlendioxidatmosphäre bzw. ein erhöhter Umgebungsdruck die für die Metastasenentwicklung wesentlichen Vorgänge Proliferation, Adhäsion und Invasion begünstigen könnte durch direkte Wirkung auf die Tumorzellen (Jacobi 1997c, Basson 2000, Puttick 1999b). Wildbrett et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass peritoneale Azidose und lokale Hypoxie während eines Pneumoperitoneums mit Veränderungen des intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsels

einhergehen, die Einfluss nehmen könnten auf essentielle Zellfunktionen wie Proliferation und Apoptose (Wildbrett 2002).

Die Auswirkungen des Pneumoperitoneums auf das Peritoneum und die Mechanismen des intraperitonealen Tumorwachstums sind noch nicht abschließend geklärt. Auch wenn man – den Ergebnissen dieser Studie folgend – davon ausgeht, dass ein Pneumoperitoneum keine rasterelektronenmikroskopisch erkennbaren Veränderungen des Mesothels verursacht, ist nicht auszuschließen, dass diese operative Technik Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen, der Ausschüttung von Zytokinen oder der lokalen Immunabwehr herbeiführt, die eine Absiedlung von Tumorzellen begünstigen könnten. Ein in diesem Zusammenhang bisher nicht ausreichend berücksichtigter Faktor könnte ein erhöhter Gasfluss während des Pneumoperitoneums sein.

Offensichtlich ist eine adäquate chirurgische Technik und die Einhaltung chirurgisch – onkologischer Prinzipien am ehesten geeignet, um eine Tumorzellverschleppung und Metastasierung zu verhindern. Weiterhin hatten im Rahmen von Studien die Instillation antiadhärenter und zytotoxischer Substanzen zur Verringerung der Metastasen geführt und sind zum Teil bereits im klinischen Einsatz (Jacobi 1999a). Der Einfluss des Pneumoperitoneums auf das intraperitoneale Tumorwachstum sowie die Entstehung von Trokarmetastasen und deren Pathomechanismen sind noch nicht endgültig geklärt und bedürfen weiterer Erforschung. Ob laparoskopische Verfahren in der Tumorchirurgie zu einer erhöhten Rate von Lokalrezidiven führen und inwieweit sie Vorteile gegenüber der konventionellen Chirurgie bieten, ist zur Zeit Gegenstand prospektiver randomisierter Studien, deren Ergebnisse hier abgewartet werden müssen.

6 Zusammenfassung

In der kurzen Zeit seit ihrer Einführung hat sich die laparoskopische Chirurgie fest in der Abdominalchirurgie etabliert und wurde in ihrem Indikationsspektrum erheblich erweitert. Zunehmend werden laparoskopische Verfahren auch in der chirurgischen Therapie maligner Tumoren eingesetzt. Jedoch haben Berichte über die Entstehung von sogenannten Trokarmetastasen zu einer kontroversen Diskussion über die Indikation der Laparoskopie in der Tumorchirurgie geführt.

Die Pathophysiologie von Trokarmetastasen und intraperitonealem Tumorwachstum ist noch nicht geklärt. Bisher wurden für diese Phänomene Eigenschaften der Operationsverfahren und instrumentelle Manipulation am Tumor verantwortlich gemacht. Grundsätzlich könnten auch ein erhöhter intraabdomineller Druck sowie das Insufflationsgas die Entstehung von Inzisionsmetastasen verursachen. Es gibt überdies Hinweise darauf, dass eine Kohlendioxidatmosphäre und ein erhöhter Umgebungsdruck eine direkte Wirkung auf Tumorzellen entfalten und deren intraperitoneale Proliferation, Adhäsion und Invasion begünstigen könnten. Im Rahmen der Laparoskopie könnten Insufflationsgas und -druck außerdem eine unmittelbare Schädigung des Bauchfells hervorrufen und so die Adhäsion und Einnistung von Tumorzellen erleichtern.

Deshalb sollte in dieser Studie untersucht werden, ob der Aufbau eines Pneumoperitoneums mit den Insufflationsgasen CO₂ oder Helium zu morphologisch fassbaren entzündlichen Veränderungen des Mesothels des Peritoneums führt, die eine Entstehung von Metastasen fördern könnten. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich die Auswirkungen von CO₂ und Helium auf das Peritoneum unterscheiden. Dazu sollte die Struktur des Peritoneums der Ratte rasterelektronenmikroskopisch erforscht werden und die Hypothese überprüft werden, ob ein Pneumoperitoneum mit CO₂/ Helium zu entzündlichen Veränderungen des Bauchfells führt.

Für das Experiment wurden die Versuchstiere in eine Kontroll- (n=5), eine Helium- (n=25) und eine CO₂-Gruppe (n=25) unterteilt. Anschließend wurde folgendes Vorgehen gewählt: Injektion einer Tumorzellsuspension in die freie Bauchhöhle und

Aufbau eines Pneumoperitoneums mit den entsprechenden Insufflationsgasen und einem Druck von 15 mm Hg für 30 min. 2, 12, 24, 48 und 96h nach Beenden des Pneumoperitoneums wurden 5 Tiere je Gruppe getötet und das parietale Peritoneum mit dem Rasterelektronenmikroskop systematisch auf Zeichen einer entzündlichen Reaktion untersucht. In der Gruppe der Kontrolltiere erfolgte die Entnahme des Bauchfells zwei Stunden nach Tumorzellinjektion.

Das Peritoneum aller Kontrolltiere war intakt. In der CO₂ – Gruppe wurden bei 4 von 25 Tieren (16 %) entzündliche Veränderungen festgestellt, in der Helium – Gruppe wurden ebenfalls bei 4 von 25 Tieren (16 %) entzündliche Veränderungen gefunden. CO₂- bzw. Helium-Pneumoperitoneum verursachten demgemäss keine globale Schädigung des Peritoneums ($P < 0,01$). Zwischen den Gruppen bestand kein Unterschied. Tumorwachstum in der Form von Tumorknoten oder einer Peritonealkarzinomatose wurde in keinem der untersuchten Präparate festgestellt.

In der vorliegenden Studie wurden infolge eines Pneumoperitoneums keine morphologischen Alterationen des Bauchfells entdeckt, die zu einer Begünstigung der Bildung von intraperitonealen Metastasen führen könnten. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die entzündliche Veränderungen des Peritoneums beschrieben, die in der Folge zu vermehrtem intraperitonealen Tumorwachstum führten. Dieser Widerspruch könnte in der Wahl des Tiermodells und der Versuchsbedingungen begründet sein. Hier sind insbesondere die Variablen Gasfluss, Versuchstier und Tumorzelllinie zu nennen.

7 Literaturverzeichnis

- Allendorf 1995 Allendorf, J.D.F. et al.: Tumor growth after laparotomy or laparoscopy. A preliminary study. Surg Endosc . 9 (1995), S.939 - 945
- Allendorf 1996 Allendorf, J.D.G. et al.: Better preservation of immune function after laparoscopic - assisted vs. open bowel resection in a murine model. J Dis Colon Rectum. 1996, S.67 - 72
- Andreoli 1994 Andreoli, S.P. et al. : Mechanisms of polymorphnuclear leucocyte mediated peritoneal mesothelial cell injury. Kidney International. 46 (1994), S.1100 - 1109
- Aoki 1999 Aoki, Y. et al.: A model of port-site metastases of gallbladder cancer: The influence of peritoneal injury and its repair on abdominal wall metastases. Surgery. 125 (1999), S.553 - 559
- Ballantyne 2002 Ballantyne GH: Robotic surgery, telerobotic surgery, telepresence, and telementoring Surg Endosc. 16 (2002), S.1389-1402
- Barberini 1977 Barberini, F. et al. : Observations by scanning electron microscopy (SEM) on the surface of mesothelial cells of different peritoneal areas of the rat. Anat Anz. 142 (1977), S. 486 - 496,
- Basson 2000 Basson, M.D. et al.: Effect of increased ambient pressure on colon cancer cell adhesion J Cell Biochem. 78 (2000), S.47 - 61
- Bedrosian 1991 Bedrosian, I. et al.: Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. Cytokine . 3 (1991), S.568 - 575
- Berci 1995 Berci, C.: Pneumoperitoneum Hrsg.: Phillips, C.H.; Rosenthal, R.J.: Operative strategies in laparoscopic surgery. 1. Berlin, Springer , 1995 S.13 - 18
- Berends 1994 Berends FJ: Subcutaneous metastases after laparoscopic colectomy. Lancet. 344 (1994), S.58
- Birbeck/Wheatley 1965 Birbeck, M.S.C.; Wheatley, D.N.: An electron microscopic study of the invasion of tumor cells in the abdominal wall Cancer Res . 25 (1965), S.490 - 497
- Blenckharn 1988 Blenckharn, J.J. et al.: Sustained anti - adherence activity of taurolidine (Taurolin) and noxythiolin (Noxyfles S). J Pharmacol. 44 (1988), S.509 - 511
- Bloechle 1999 Bloechle, C. et al. : A pneumoperitoneum perpetuates severe damage to the ultrastructural integrity of parietal peritoneum in gastric

- perforation - induced peritonitis in rats Surg Endosc 13 (1999). 683 - 688,
- Böhm 1999a Böhm, B. et al.: Leber- und Nierenfunktion nach laparoskopischer und konventioneller Resektion kolorektaler Tumore - Ergebnisse aus einer prospektiv randomisierten Studie. Visceralchirurgier. 34 (1999), S.20 - 24
- Bouvy 1996 Bouvy, N.C. et al.: Impact of gas(less) laparoscopy and laparotomy on peritoneal tumor growth and abdominal wall metastases. Ann Surg. 24 (1996), S.694 - 701
- Braet 1997 Braet, F. et al.: Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. J Microsc. 186 (1997), S.84 - 87
- Bray 1993 Bray, D.F. et al.: Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II and critical point drying methods for scanning electron microscopy. Microsc Res Technique. 26 (1993), S.489 - 495
- Buck 1973 Buck, C.R.: Walker 256 tumor implantation in normal and injured peritoneum studied by electron microscopy, scanning electron microscopy and autoradiography Cancer Res. 33 (1973), S.381 - 383
- Chmielnicki 1994 Chmielnicki, Z. et al.: Effect of CO₂ insufflation into the peritoneal cavity on selected indices of respiratory system function during laparoscopic cholecystectomy. Wiad lec. 47 (1994), S.503 - 505
- Collet 1995 Collet, D. et al.: Peritoneal host defence are less impaired by laparoscopy than by open operation. Surg Endosc. 9 (1995), 1059 - 1064,
- Collins 1988 Collins, R. et al.: Reduction in fatal pulmonary embolism and venous thrombosis by perioperative administration of subcutaneous heparin. Overview of results of randomized trials in general, orthopedic and urologic surgery N Engl J Med. 318 (1988), S.1163 - 1173
- Cunningham 1994 Cunningham, A.J. et al.: Laparoscopic cholecystectomy: anesthetic implications. Anesth. Analg.. 76 (1994), S.376 - 381
- Curet 2000 Curet, M.J. et al.: Laparoscopically assisted colon resection for colon carcinoma: perioperative results and long - term outcome. Surg endosc. 14 (2000), S.1062 - 1066
- Daphan 1999 Daphan, C.D. et al.: Effects of laparotomy and carbon dioxide and air pneumoperitoneum on cellular immunity and peritoneal host defences in rats. Eur J Surg. 165 (1999), S.253 - 258
- Dexter 1999 Dexter, S. P. et al.: Hemodynamic consequence of high- and low - pressure capnoperitoneum during laparoscopic cholecystectomy Surg endosc. 13 (1999), S.376 - 381
- Dizerega/Rodgers 1992 Dizerega, G.S.; Rodgers, K.E. : The Peritoneum. 1. New York, 1992 S.2 - 22

- Dobbie 1989 Dobbie, J.W.: Morphology of the peritoneum in CAP Blood Purif. 7 (1989), S.74 - 85
- Eleftheriads 1996 Eleftheridis, E. et al.: Splanchnic ischemia during laparoscopic CCE Surg Endosc. 10 (1996), S.324 - 326
- Fernandez-Cruz 1998 Fernandez - Cruz, L. et al.: Helium and carbon dioxide pneumoperitoneum in patients with pheochromocytoma undergoing laparoscopic adrenalectomy. World J Surg. 22 (1998), S.1250 - 1255
- Fleshman 1999 Fleshman, J.W. et al.: Laparoscopic vs. open abdominoperineal resection for cancer Dis Colon Rectum. 42 (1999), S.930 - 939
- Franklin 1996 Franklin, M.E. et al. : Prospective comparison of open vs. laparoscopic colon surgery for carcinoma. Dis Colon Rectum. 39 (1996), S.35 - 46
- Franklin 2000 Franklin, M.E. et al. : Laparoscopic surgery for stage III colon cancer: Long term follow up. Surg endosc. 14 (2000), S.612 - 616
- Galizia 2001 Galizia, G. et al.: Hemodynamic and pulmonary changes during open, carbon dioxide pneumoperitoneum and abdominal wall - lifting cholecystectomy. A prospective, randomized study. Surg endosc. 15 (2001), S.477 - 483
- Gebhard 2001 Gebhard, H.: Minimal invasive Chirurgie Hrsg.: Henne - Bruns, D.; Dürig, M.; Kremer, B.: Duale Reihe: Chirurgie. 1. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2001 S.623 - 639
- Goldstein 1993 Goldstein, D.S. et al.: Inhibition of peritoneal tumor cell implantation: Model for laparoscopic cancer surgery. J Endourol. 1993, 7, S.237 - 241
- Guo 1993 Guo, S. et al.: Morphological response of the peritoneum and spleen to intraperitoneal biomaterials. Int J Artif Organs. 16 (1993), S.276 - 284
- Gusnard/Kirschner 1977 Gusnard, D.; Kirschner, R. : Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying. J Microsc. 110 (1977), S.51 - 57
- Haney 2000 Haney, A.F.: Identification of macrophages at the site of peritoneal injury: evidence supporting a direct role for peritoneal macrophages in healing injured peritoneum Fertil Steril. 73 (2000), S.988 - 995
- Hartley 2000 Hartley, J.E. et al.: Patterns of recurrence and survival after laparoscopic and conventional resections for colorectal carcinoma. Ann Surg. 232 (2000), S.181 - 186
- Hazebroek 2002 Hazebroek, E.J. et al.: Impact of temperature and humidity of carbon dioxide pneumoperitoneum on body temperature and peritoneal morphology. J Laparoendosc Adv Surg Tech. 5 (2002), S.355 - 64

- Henderson 1987 Henderson, I.S. et al.: Structure of the Peritoneum and changes brought by infection *Contr Nephrol.* 57 (1987), S.30 - 40
- Henrich 1986 Henrich, M.H.: Tierexperimentelle Bariumperitonitis (Ratte, Hund) *Chirurg.* 57 (1986), S.801 - 804
- Hyltander 2002 Hyltander A et al.: The transfer of basic skills learned in an laparoscopic simulator to the operating room. *Surg endosc.* 16 (2002), S.134-1329
- Iwase 1993 Iwase, K. et al.: Serial Changes in renal function during laparoscopic surgery *Eur Surg Res.* 25 (1993), S.203 - 212
- Jacobi 1997a Jacobi, C.A. et al.: Peritoneal instillation of taurolidin and heparin for preventing intraperitoneal tumor growth and trocar metastases in laparoscopic operations in the rat model. *Arch Chir.* 382 (1997), S.31 - 36
- Jacobi 1997b Jacobi, C.A. et al.: Pneumoperitoneum with carbon dioxide stimulates growth of malignant colonic cells. *Surgery.* 121 (1997), S.72 - 78
- Jacobi 1997c Jacobi, C.A. et al.: Inhibition of peritoneal tumor cell growth and implantation i laparoscopic surgery in a rat model. *Am J Surg.* 121 (1997), S.72 - 78
- Jacobi 1998a Jacobi, C.A. et al.: Increased systemic inflammation after laparotomy vs. laparoscopy in an animal model of peritonitis. *Arch Surg.* 133 (1998), S.258 - 262
- Jacobi 1998b Jacobi, C.A. et al. : The impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on immunologic function and tumor growth in a rat model *Dig Surg.* 15 (1998), S.110 - 116
- Jacobi 1998c Jacobi, C.A. et al.: The impact of elevated intraabdominal pressure during laparoscopy on tumor growth and trocar metastases in a rat model. *Br J Surg.* 85 (1998), S.72 - 78
- Jacobi 1999a Jacobi, C.A. et al.: New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat. *Dig Surg.* 16 (1999), S.393 - 399
- Jacobi 2000a Jacobi, C.A. et al.: Cardiopulmonary changes during laparoscopy and vessel injury: comparison of CO₂ and helium in an animal model. *Langenbecks Arch Surg.* 385 (2000), S.459 - 466
- Johannsen 1989 Johannsen, G. et al. : The effect of general anesthesia on the hemodynamic events during laparoscopy with CO₂ insufflation. *Acta Anaesthesiol Scand.* 33 (1989), S.132 - 136
- Johnson 1997 Johnson, P.L. et al.: Laparoscopy: Gasless vs. CO₂ Pneumoperitoneum *J Reprod Med.* 42 (1997), 5, S.255 - 259
- Jonecko 1990 Jonecko, A. : Das menschliche Peritoneum und die menschliche

- Peritonitis in ultrastrukturellen und immunhistochemischen Untersuchungen Z Mikrok Anat Forsch. 104 (1990), S.907 - 943
- Juhl 1994 Juhl, H. et al.: Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. Int J Cancer. 57 (1994), S.330 - 335
- Junqueira/Carneiro 1996 Junqueira, L.C.; Carneiro, J.: Histologie. . 4. korrigierte und übersetzte Auflage Berlin, Springer Verlag, 1996 S.326 - 341
- Karaviannakis 1997 Karaviannakis A.J. et al.: Systemic stress response after laparoscopic or open cholecystectomy: a randomized trial. Br J Surg. 84 (1997), S.467 - 471
- Kaufman 1982 Kaufman, O.Y. et al. : Responses of peritoneal mesothelial cells in rats with aseptic and bacterial peritonitis Bull Exp Biol Med. 94 (1982), S.100 - 104
- Kim 2002 Kim, W.W. et al.: Comparison of immune preservation between CO2 pneumoperitoneum and gasless abdominal lift laparoscopy. JSLS. 6 (2001), 1, S.11 - 15
- Kimura 1985 Kimura A. et al. : Peritoneal mesothelial cell injury factors in rat cancerous ascites Cancer Res. 45 (1985), S.4330 - 4333
- Kirk 1997 Kirk, R.M.: Chirurgische Techniken. 3. erweiterte Stuttgart, Georg Thieme, 1997
- Koga 1980 Koga, S. et al.: A scanning electron microscopic study on the peritoneal implantation of ascites hepatoma AH100B cells in rats. Gann. 71 (1980), S.8 - 13
- Koivusalo 1998 Koivusalo, A.M. et al.: A comparison of gasless mechanical and conventional carbon dioxide pneumoperitoneum methods for laparoscopic cholecystectomy Anesth Analg. 86 (1998), 1, S.153 - 158
- Koks 2000 Koks, C.A.M. et al.: Menstruum induces changes in mesothelial cell morphology Gynecol Obstet invest. 50 (2000), S.13 - 18
- Kopernik 1998 Kopernik, G. et al.: The effect of a high partial pressure of carbon dioxide environment on metabolism and immune functions of human peritoneal cells. Relevance to carbon dioxide pneumoperitoneum. Am J Obstet Gynecol. 179 (1998), S.1503 - 1510
- Kremer, Platzer, Schreiber, Steichen 2001 Steichen et al: Instruments and Methods Hrsg.: Kremer K, Platzer W, Schreiber HW, Steichen FM : Minimally invasive abdominal Surgery. 1. Stuttgart, New York, Thieme, 2001 S.6-58
- Kuntz 2000 Kuntz, C. et al.: Effect of pressure and gas type on intraabdominal, subcutaneous and blood pH in laparoscopy. Surg Endosc. 12 (2000), S.367 - 371

- Lacy 1995 Lacy A.M. et al.: Short - term outcome analysis of a randomized study comparing laparoscopic versus open colectomy for colon cancer. *Surg endosc.* 9 (1995), S.1101 - 1105
- Larsen 2001 Larsen, J.F. et al: Randomized comparison of conventional and gasless laparoscopic cholecystectomy: operative technique, postoperative course and recovery. *Gastrointest Surg.* 5 (2001), 3, S.330 - 335
- Lauroy 1994 Lauroy, J. et al.: Metastatic recurrence at cannula site: should digestive cancers still be managed by laparoscopy. *Br J Surg.* 81 (1994), *Suppl.*, S.31
- Lechaux 2002 Lechaux, D. et al.: Five - year results of 206 laparoscopic left colectomies for cancer. *Surg endosc.* 2002, S.DOI: 10.1007/s00464-002-9011-7
- Lee 1998 Lee, et al.: Traumatic handling of the tumor independent of pneumoperitoneum increases port site implantation rate of colon cancer in a murine model. *Surg Endosc.* 12 (1998), S.828 - 834
- Lethola 1986 Lethola, A. et al.: The effect of peritoneal exsudate on peritoneal morphology in experimental acute pancreatitis: A histologic and scanning electron microscopic study. *Scand J gastroenterol.* 21 (1986), S.1173 - 1179
- Lierse 1985 Lierse, W.: *Das Peritoneum: Anatomische Grundlagen Chirurg.* 56 (1985), S.357 - 359
- Lord 1998 Lord, R.V.N. et al.: Incidence of deep vein thrombosis after laparoscopic vs. minilaparotomy CCE *Arch Surg.* 133 (1998), S.967 - 973
- Majeed 1996 Majeed, A.W. et al. : Randomised, prospective, single - blind comparison of laparoscopic versus small - incision cholecystectomy *Lancet.* 347 (1996), S.989 - 994
- Mathew 1996 Mathew, G. et al.: Wound metastases following laparoscopic and open surgery for abdominal cancer in a rat model. *Br J Surg.* 83 (1996), S.1087 - 1090
- Mathew 1997 Mathew, G. et al.: The effect of laparoscopy on the movement of tumor cells and metastasis to surgical wounds. *Surg Endosc.* 11 (1997), S.1163 - 1166
- McCourt 2000 McCourt, M. et al.: Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol.* 7 (2000), S.685 - 691
- McMahon 1993 McMahon, A.J. et al.: Comparison of metabolic responses to laparoscopic and minilaparotomy cholecystectomy. *Br J Surg.* 80 (1993), S.1255 - 1258
- McMahon 1994 McMahon, A.M. et al.: Helium pneumoperitoneum for laparoscopic cholecystectomy: ventilatory and blood gas changes. *Br J Surg.* 81

- (1994), S.1033 - 1036
- Meyer/Hüttl 2001 Meyer, G.; Hüttl, T.P.: Laparoscopic surgery in Europe: Development and education: a German perspective, *Surgical Endoscopy* . 15 (2001), S.229 - 231
- Michailova 1999 Michailova, K. et al.: Scanning and transmission electron microscopic study of visceral and parietal peritoneal regions in the rat. *Ann Anat.* 181 (1999), S.253 - 260
- Milsom 1998 Milsom, J.W. et al.: A prospective, randomized trial comparing laparoscopic versus conventional techniques in colorectal cancer surgery: a preliminary report. *J Am Coll Surg.* 187 (1998), S.46 - 54
- Milsom 1998i Milsom, J.W. et al.: A prospective, randomised trial comparing laparoscopic versus conventional techniques in colorectal cancer surgery: a preliminary report. *J AM Coll Surg.* 187 (1998), S.46 – 54
- Miura 2001 Miura, Y. et al.: Gasless hand - assisted laparoscopic surgery for colorectal cancer: an option for poor cardiopulmonary reserve. *Dis Colon Rectum.* 44 (2001), 6, S.896 - 898
- Murdock 2000 Murdock CM et al. : Risk factors for hypercarbia, subcutaneous emphysema, pneumothorax, and pneumomediastinum during laparoscopy *Obstet Gynecol.* . 95 (2000), S.704-709
- Neuhaus 2001 Neuhaus, S.J. et al.: Helium and other alternative Insufflation gases for laparoscopy. A review. *Surg Endosc.* 15 (2001), S.553 - 560
- Neuhaus 2001b Neuhaus, S.J. et al.: Metabolic and immunologic consequences of laparoscopy with helium or carbon dioxide insufflation: a randomized clinical study *ANZ J Surg.* 71 (2001), S.447 - 452
- Nezhat 1998 Nezhat, C.R. et al.: *Laparoscopic Surgery Hrsg.: Niederhuber, H.E.: Fundamentals of surgery.* 1. Stanford, Connecticut, Appleton and Lange, 1998 S.116 - 128
- Nilsson 2000 Nilsson, G. et al. : Randomized clinical trial of laparoscopic versus open fundoplication: blind evaluation of recovery and discharge period. *Br J Surg.* 87 (2000), S.873 - 878
- Ogihara 1999 Ogihara, Y. et al.: Abdominal wall lift versus carbon dioxide insufflation for laparoscopic resection of ovarian tumors *J Clin Anaeth.* 11 (1999), 5, S.406 - 412
- Ordemann 2001 Ordemann, J. et al.: Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections - Results of a prospective randomized trial. *Surg Endosc.* 15 (2001), S.600 - 608
- Ortega 1996 Ortega, A.E. et al.: A prospective randomized comparison of the metabolic and stress hormonal responses of laparoscopic and open cholecystectomy *J AM Coll Surg.* 183 (1996), S.249 - 256
- Papadimitriou 1973 Papdimitriou, J.M. et al.: Surface characteristics of macrophages,

- epithelioid and giant cells using scanning electron microscopy. *Exp cell Res.* 76 (1973), S.353 - 362
- Perttila 1999 Perttila, J. et al.: Immune response after laparoscopic and conventional nissen fundoplication. *Eur J Surg.* 21 (1999), S.165 - 170
- Poulin 1999 Poulin, E.C. et al.: Laparoscopic resection does not adversely affect early survival curves in Patient undergoing surgery for colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg.* 229 (1999), S.487 - 492
- Puttick 1999a Puttick, M.I.: Full laparotomy in a warm humid environment causes less postoperative tumour growth than full laparotomy in room air. Data presented of the Third International Laparoscopic Physiology Conference.. New York, March 1999
- Puttick 1999b Puttick, M.I. et al.: Carbon dioxide pneumoperitoneum increases tumour cell invasiveness. Data presented of the Third International Laparoscopic Physiology Conference. New York, March 1999
- Raz 1976 Raz, A. and Goldman, R.: Effect of hashish compounds on mouse peritoneal macrophages *Lab Invest.* 68 (1976), S.69 - 76
- Reilly 1996 Reilly, W.T. et al.: Wound recurrence following conventional treatment of colorectal cancer: A rare but perhaps underestimated problem. *Dis colon rectum.* 39 (1996), S.200 - 207
- Rittmann/Koller 1994 Rittmann, W.W.; Koller, C.: *Laparoskopische Chirurgie - Manual für das Operationsteam.* 1. Bern, Verlag Hans Huber, 1994
- Roberts 1997 Roberts, M.W. et al.: Cardiopulmonary responses to intravenous infusion of soluble and relatively insoluble gases. *Surg Endosc.* 11 (1997), S.341 - 346
- Sarli 2000 Sarli l et al.: Prospective randomized trial of low-pressure pneumoperitoneum for reduction of shoulder-tip pain following laparoscopy. *Br J Surg.* 87(2000), S.161-1165
- Schaeff 1998a Schaeff, B. et al.: elektronenmikroskopische Veränderungen am Peritoneum nach laparoskopischen Operationen *Langenbecks Arch Chir Suppl* 1. 1998, S.571 - 573
- Schaeff 1998b Schaeff, B. et al.: Port Site recurrence after laparoscopic surgery: A review. *Dig Surg.* 12 (1998), S.485 - 495
- Schiedeck 2000 Schiedeck, T.H. et al.: Laparoscopic surgery for the cure of colorectal cancer: results of a German five - center study. *Dis Colon Rectum.* 43 (2000), S.1 - 8
- Schneider 1999 Schneider, C. et al.: Surgical technique is a major factor in the incidence of port - site recurrences. Data Presented of the third international laparoscopic physiology conference. New York, March 1999

- Schulte-Steinberg 1996 Schulte - Steinberg, H. et al.: Sind Risikopatienten zur minimal - invasiven Operation mit CO₂ - Pneumoperitoneum geeignet? Chirur. 67 (1996), S.72 - 76
- Schulze 1999 Schulze, S. et al.: Cardiovascular and respiratory changes and convalescence in laparoscopic colonic surgery. Arch Surg. 134 (1999), 10, S.1112 - 1118
- Schwenk 1998 Schwenk, W. et al.: laparoscopic versus conventional colorectal resection: a prospective randomized study of postoperative ileus and early postoperative feeding. Langenbecks Arch Surg. 383 (1998), S.49 - 55
- Schwenk 1999 Schwenk, W. et al.: Pulmonary function following laparoscopic or conventional colorectal resection: a randomized controlled evaluation. Arch Surg. 134 (1999), S.6 - 12
- Sendt 1999 Sendt, W. et al.: Local inflammatory peritoneal response to operative trauma: studies on cell activity, cytokine expression, and adhesion molecules. Eur J Surg. 165 (1999), 11, S.1024 - 1030
- Skipper 1989 Skipper, D. et al.: Enhanced growth of tumour cells in healing colonic anastomoses and laparotomy wounds. Int J Colorect Dis. 1989, S.172 - 177
- Squirrel 1998 Squirrel, D.M. et al. : A randomized, prospective, blinded comparison of postoperative pain, metabolic response, and perceived health after laparoscopic and small incision cholecystectomy Surgery. 123 (1998), S.528 - 533
- Stage 1997 Stage, J.H. et al.: Prospective randomized study of laparoscopic versus open colonic resectable adenocarcinoma. Br J Surg. 84 (1997), S.391 - 396
- Stuttman 1995 Stuttman, R. et al.: Hemodynamic changes during laparoscopic cholecystectomy in the high - risk patient. Endosc surg. 3 (1995), S.174 - 179
- Suematsu 2001 Suematsu, T. et al.: Morphology of the murine peritoneum after pneumoperitoneum vs. laparotomy: A scanning electron microscopy study. Surg Endosc. 15 (2001),
- Tate 1993 Tate, J.J.T. et al.: Laparoscopic versus open appendectomy: a prospective randomised trial. Lancet. 342 (1993), S.633 - 637
- Verger 1983 Verger, C. et al. : Acute changes in peritoneal morphology and transport properties with infectious peritonitis and mechanical injury Kidney International. 23 (1983), S.823 - 831
- Virtanen 1984 Virtanen, J. et al. : The effect of fixation on corneal endothelial cell dimensions and morphology in scanning electron microscopy. Acta Ophthal. 62 (1984), S.577 - 585
- Volpino 1998 Volpino, P. et al.: Hemodynamic and pulmonary changes during and

- after laparoscopic cholecystectomy. A comparison with traditional surgery. Surg endosc. 12 (1998), S.119 - 123
- Volz 1999a Volz, J. et al.: Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. Surg Endosc. 13 (1999), S.611 - 619
- Volz 1999b Volz, J. et al.: The influence of pneumoperitoneum used in laparoscopic surgery on an intraabdominal tumor growth. Cancer. 86 (1999), S.770 - 774
- Wallace 1997 Wallace, D. H. et al.: Randomized trial of different insufflation pressures for laparoscopic cholecystectomy Brit J Surg. 84 (1997), S.455 - 458
- Watters/Buck 1972 Watters, W.B.; Buck, R.C.: Scanning electron microscopy of mesothelial regeneration in the rat Lab Invest. 26 (1972), S.604 - 609
- Wexner 1995 Wexner, S.D. et al.: Port site metastases after laparoscopic colorectal surgery for cure of malignancy. Br J Surg. 82 (1995), 3, S.295 - 298
- Whelan 1996 Whelan, R.L. et al.: Trocar sit recurrence is unlikely to result from aerosolization of tumor cells. Dis Colon Rectum. 39 (1996), S.7 - 13
- Whelan 2001 Whelan, R.L.: Laparotomy, Laparoscopy, cancer and beyond Surgical endosc. 15 (2001), S.110 - 115
- Whitaker/Papadimitriou 1985 Whitaker, D.; Papadimitriou, J.: Mesothelial healing: Morphological and kinetic investigations. J Pathology. 145 (1985), S.159 - 175
- Wildbrett 2002 Wildbrett, P. et al.: Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function. Surg Endosc. 16 (2002),
- Wurst 1996 Wurst, H. et al.: Zur Frage des CO₂ - Speicherung bei laparoskopischer Cholecystektonie mit CO₂ - Pneumoperitoneum der Anaesthesist. 44 (1996), S.147 - 153

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jens Jakob, geb. am 05.11.1974 an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Einfluss des Pneumoperitoneums auf die Ultrastruktur des Peritoneums: Eine rasterelektronenmikroskopische Studie“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar, auch nicht in Teilen. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Jens Jakob

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jakob
Vorname: Jens
Geburtstag/-ort: 05.11.1974 in Lingen/Ems
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Religion: römisch-katholisch

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschule St. Mauritius in Hildesheim
1985 – 1987 Orientierungsstufe St. Augustinus in Hildesheim
1987 – 1994 Bischöfliches Gymnasium Josephinum in Hildesheim
09.06.1994 Allgemeine Hochschulreife
08/1991 – 02/1992 Austauschschüler in Chesaning/Michigan, USA

Zivildienst

1994 – 1995 Johanniter Unfallhilfe in Hildesheim, Ausbildung zum staatlich anerkannten Rettungssanitäter

Studium

WS 1995/96 Studium der Informatik an der Universität Hildesheim
1996 – 1999 Studium der Medizin an der Universität Hamburg,
1999 – 2003 Studium der Medizin an der Alexander von HU – Berlin
10.06.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Erlaubnis zur Ausübung des ärztlichen Berufs als Arzt im Praktikum.

Berufliche Tätigkeit

Seit 01.08.2003 Arzt im Praktikum in der Klinik für Chirurgie und chirurgische Onkologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin – Buch, Robert – Rössle – Klinik.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Christoph Jacobi und Herrn Dr. med. Jürgen Ordemann für die hervorragende Betreuung, ihre ständige Unterstützung, Beratung und Motivation zur Planung und Ausführung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. Bachmann danke ich für die Bereitstellung des DSM 982 Gemini und die ausgezeichnete Zusammenarbeit, sein reges Interesse und seine konstruktive Kritik.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Führer für die exzellente Betreuung der Versuchstiere und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.

Frau Holland danke ich für die erstklassige Einarbeitung in das elektronenmikroskopische Labor, die Weitergabe ihrer Erfahrung und ihre Hilfe bei kleinen und größeren rasterelektronenmikroskopischen Problemen.

Für ihre Geduld und Rechenkünste danke ich Frau Dr. rer. nat. Siebert aus dem Institut für Medizinische Biometrie am Klinikum Westend.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern für Freiheit, Vertrauen und Unterstützung.

Danke Anna.